



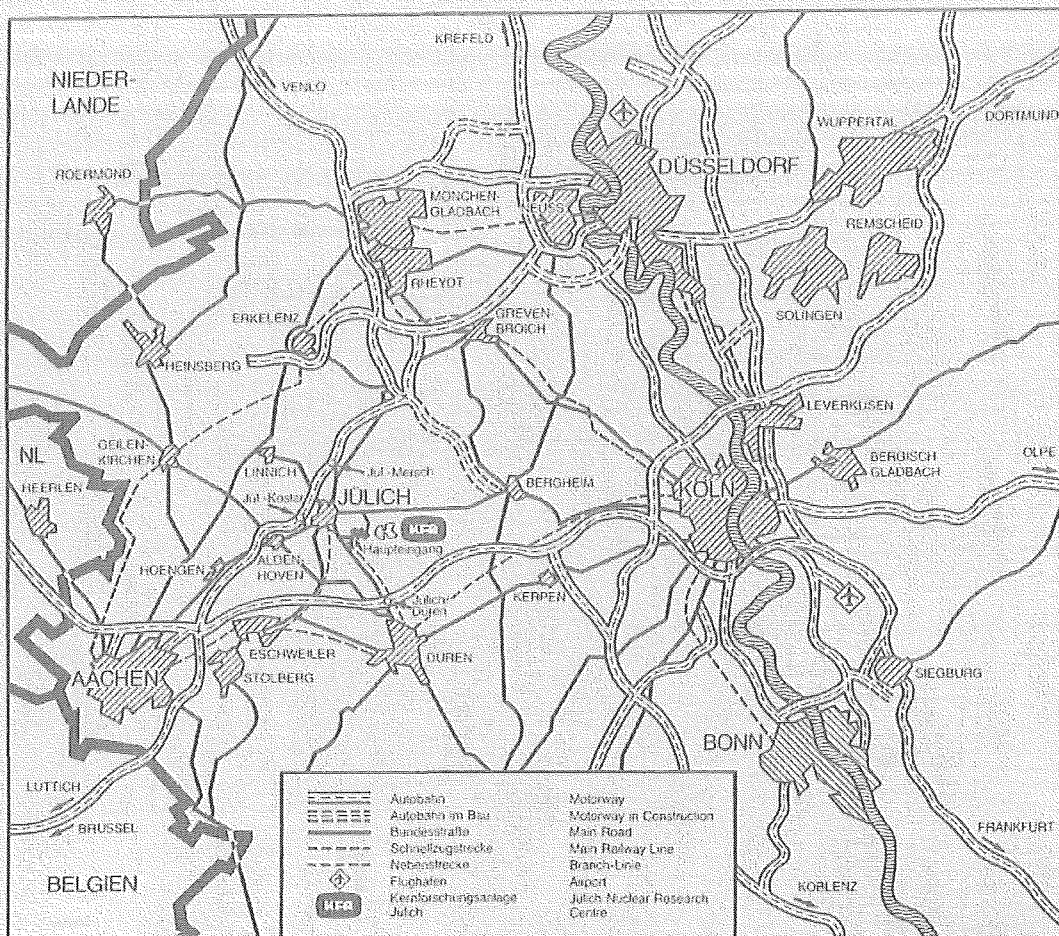
KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH
Projektträger für Umweltchemikalien

**Methoden zur
ökotoxikologischen Bewertung
von Chemikalien**

**Band 1:
Aquatische Systeme
Bericht 1978 – 1982**

Herausgeber
H.-M. Biehl,
F. Führ
K. Seibert

**Jül - Spez - 163
Juli 1982
ISSN 0343-7639**



Als Manuskript gedruckt

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 163

Projektträger für Umweltchemikalien Jül - Spez - 163

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/610 · Telex: 833 556 kfa d

**Methoden zur
ökotoxikologischen Bewertung
von Chemikalien**

**Band 1:
Aquatische Systeme
Bericht 1978 – 1982**

Herausgeber
H.-M. Biehl,
F. Führ
K. Seibert

Kurzfassung

Aus dem aquatischen Bereich werden in 8 Forschungsberichten Testmethoden vorgestellt, die sich mit dem Abbauverhalten, der Akkumulation und Wirkung von Chemikalien befassen. Diese Arbeiten wurden im Rahmen des vom BMFT seit 1978 finanzierten Projektes "Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien" durchgeführt.

Im Einzelnen wurde das Abbauverhalten unter aeroben und anaeroben Bedingungen, die Bioakkumulation und Elimination und die subletale Wirkung von Chemikalien auf verschiedene aquatische Organismen untersucht. Außerdem wurden die Einsatzmöglichkeiten künstlicher Gewässeranlagen für ökotoxikologische Fragestellungen geprüft. In fast allen Arbeiten wurden Referenzchemikalien eingesetzt, um den Anwendungsbereich der Testmethoden und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

Summary

In 8 research reports test methods are presented, which deal with the degradation potential, accumulation and effects of chemicals in the aquatic environment. These projects had been carried out in the frame of the program "Methods for the ecotoxicological evaluation of chemicals" financed by the Federal Minister for Research and Technology since 1978.

The degradation behaviour under aerobic and unaerobic conditions, the bioaccumulation and elimination and sublethal effects of chemicals on different aquatic organisms were studied in detail. Moreover the usefulness of artificial ponds for ecotoxicological testing of chemicals had been examined. To check the scope of the test methods and to guarantee the comparability of the results, reference-chemicals had been introduced in nearly all projects.

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Liste der Referenzchemikalien	4
3.	Projektübersichten	5
3.1	Finanzübersicht	5
3.2	Thematische Übersicht	7
4.	Forschungsberichte "Aquatische Systeme"	8
4.1	Fischer, Gerike; Düsseldorf	8
4.2	Wagner, Bräutigam; Stuttgart	20
4.3	Hanke, Bittner, Horn, Müller, Keppler; Karlsruhe	42
4.4	Bemmer, Lillelund; Hamburg	64
4.5	Langer, Schütz, Lillelund; Hamburg	74
4.6	Schreiber, Besch; Karlsruhe	95
4.7	Bibo, Müller; Heidelberg	111
4.8	Hansen, Schiecke; Berlin	127

1. Einleitung

Der vorliegende Bericht enthält Ergebnisse des Forschungsprogramms "Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien". Dieses wurde 1977 gemeinsam von dem Bundesminister für Forschung und Technologie (BMFT) und dem Bundesminister des Inneren (vertreten durch das Umweltbundesamt) ausgeschrieben und wird seit 1978 durch den BMFT finanziert. Allgemeines Förderziel ist die Entwicklung von Methoden zur Erfassung, Bewertung und Kontrolle von chemischen Umweltbelastungen, damit Schäden und Nachteile aus menschlichen Eingriffen in ökologische Systeme reduziert werden können. Daraus leiten sich die beiden Teilaufgaben des Projektes ab:

- Prüfmethoden und -verfahren zur Feststellung der lokalen und allgemeinen Umweltbelastung durch Chemikalien und
- Modelle zur Planung und Überwachung von ökologischen Systemen zu entwickeln.

Das Forschungsprogramm wurde begleitend zu der Chemikaliengesetzgebung in der Bundesrepublik Deutschland und ähnlichen Aktivitäten der Europäischen Gemeinschaft konzipiert. Im Hinblick auf die hierin vorgesehene Bewertung der Umweltgefährlichkeit von "neuen Stoffen" sollen im Rahmen des Projektes neue Teststrategien und -methoden zur Abschätzung der Umweltwirkungen von Chemikalien erarbeitet und beschriebene verbessert, vereinfacht und standardisiert werden.

Das Umweltverhalten wird durch eine Vielzahl von Eigenschaften bestimmt. Die Arbeiten befassen sich daher mit einem breiten Spektrum von unter dem Begriff "Ökotoxikologie" subsumierten Verhaltensmustern. Diese reichen von der Toxizität, Abbaubarkeit/Persistenz und Akkumulation bis zur Verlagerung innerhalb und zwischen verschiedenen Umweltkompartimenten. Dementsprechend werden verschiedene Ausschnitte aus aquatischen und terrestrischen Lebensräumen sowie der Atmosphäre betrachtet. Innerhalb dieser Kompartimente werden biotische und abiotische Wechselwirkungen untereinander und zwischen Umweltchemikalien anhand verschiedener Testgrößen untersucht.

Mit den vielfältigen experimentellen Ansätzen sollen folgende Aufgaben gelöst werden:

- Entwicklung, Verbesserung, Vereinfachung und Standardisierung von Prüfverfahren zu erproben,
- den Aussagewert einer Methode exakt abzugrenzen, da jede Methode nur einen Ausschnitt aus einem Verhaltensmuster simuliert,
- verschiedene, voneinander unabhängige Untersuchungsverfahren (zur Ermittlung derselben Eigenschaft) zu vergleichen,
- die ökologische Relevanz von Teststrategien und -methoden zu ermitteln.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Einzelvorhaben zu erreichen, wurden 1978 von einem ad-hoc Ausschuß des BMFT beim Projektträger 26 Referenzchemikalien (s. Tab. S. 4) ausgewählt (Referenzchemikalien als Hilfsmittel zur Auswertung eines Forschungsprogrammes - Ziele und Kriterien für die Auswahl (B. Scheele, Chemosphere 9, 293-309, 1980)). Zumindest thematisch aneinandergrenzende Vorhaben werden so durch Bearbeitung gleicher Chemikalien verbunden. Es wird erhofft,

- die im Hinblick auf die genannte Zielsetzung erforderliche Vergleichbarkeit der Vorhaben zu erreichen,
- einen Gesamtüberblick und vertiefte Informationen über das Verhalten einer Chemikalie zu gewinnen, indem die Ergebnisse nach dem Prinzip von Testbatterien aneinandergereiht werden können,
- Hinweise auf Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften und dem Verhalten von Chemikalien in der Umwelt zu erhalten,
- einen Beitrag zur Lösung der Probleme, die bei der Prüfung "neuer Chemikalien" nach dem Chemikaliengesetz und dessen Ausführungsverordnungen entstehen, zu leisten.

Die allgemeine Charakterisierung dieser 26 Referenzchemikalien, ihre umweltrelevanten Daten (Produktionsmenge, Mobilität, Persistenz, Akkumulation und Schadwirkung), ihr Vorkommen in der

Umwelt, Angaben zur Analytik sowie eine Literaturübersicht finden sich in den Merkblättern über Referenzchemikalien der Projektträgerschaft Umweltchemikalien. Die Firma Riedel de Haen AG bietet unter dem Stichwort "OEKANAL-Referenzchemikalien" 21 dieser ausgewählten Standards mit einem Reinheitsgrad über 98 % an. Angaben über die Verunreinigungen sowie weitere Spezifikationen können über den Projektträger zur Verfügung gestellt werden.

Da das Forschungsprogramm langfristig angelegt ist und auch laufend neue Vorhaben in das Projekt aufgenommen werden, enthält der vorliegende Band 1 nur die bis zum 30.04.1982 abgeschlossenen Arbeiten aus dem Themenbereich "Aquatische Systeme". Die Thematik und der Stand der noch laufenden Vorhaben ist dem jährlich vom Projektträger zusammengestellten Projektbericht zu entnehmen. Dieser enthält Kurzberichte der Themenbereiche "Aquatische Systeme", "Terrestrische Ökosysteme", "Pflanzliche Zellkulturen und isolierte Pflanzenzellen", "Boden und Modellsysteme" und "Photochemischer Abbau".

Der einleitenden Finanzierungsübersicht sind Förderungszeitraum und Bewilligungssumme der abgeschlossenen Vorhaben zu entnehmen.

Liste der als Referenzchemikalien ausgewählten
Substanzen

SYSTEMATISCHE BEZEICHNUNG	ABK. u. ANDERE CHEM. BEZEICHNUNG
Hexachlorbenzol	HCB, Perchlorbenzol
1.1.1-Trichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthan	DDT, Dichlor-diphenyl-trichlor- äthan
1.1-Dichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthan	DDD, Tetrachlordiphenyläthan
1.1-Dichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthylen	DDE, 1,1-bis-(4-chlorphenyl- äthan
Di-(2-äthylhexyl)-phthalat	DOP
Carbonyldiamid	Harnstoff
Perylen	
Fluoranthren	
Benzol	
Toluol	
Phenol	
2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol	
Pentachlorphenol	PCP
Anilin	
p-Chloranilin	
Na-Dodekylbenzolsulfonat	LAS, Marlon A ^R ca. 12 Typen
Dichlorphenoxyessigsäure	2,4-D
Trichlorphenoxyessigsäure	2,4,5-T
2-Äthylamino-4-chlor-6- (2-propyl-amino)-1.3.5-triazin	Atrazin
HgCl ₂	
Methanol	
Äthylacetat	
Trichloräthylen	
Äthylen	
1,2,4-Trichlorbenzol	

3.1 Finanzübersicht

KENN- ZEICHEN	DURCHFÜHRENDE STELLE VORHABENLEITER	THEMA	FÖRDERSUMME IN TDM JAHR GESAMT	LAUFZEIT
O3 7207	Henkel KG, Düsseldorf P. GERIKE	Untersuchungen im Hinblick auf ein Testsystem zur Prüfung der Abbaubarkeit von Chemikalien unter den Aspekten Oberflächen- wasser und Kläranlage	1978: 69,2 356,025 1979: 176,75 1980: 110,075	01.08.78 - 31.12.80
O3 7221	Universität Stuttgart R. WAGNER	Entwicklung und Erprobung einer Methode zur Untersuchung des Abbauverhaltens von organi- schen Substanzen unter anaero- ben Milieubedingungen	1978: 51,7 216,6 1979: 89,9 1980: 75,0	01.10.78 - 31.12.80
O3 7244	Universität Karlsruhe W. HANKE	Untersuchungen der physiolo- gischen Wirkungen von Schad- stoffen bei Karpfen	1979: 64,85 263,0 1980: 168,0 1981: 30,15	01.05.79 - 30.04.81
O3 7211	Universität Hamburg K. LILLELUND	Entwicklung und Erprobung eines Verhaltenstestes mit Fischen im Durchfluß zur Beur- teilung der subakuten und chro- nischen Toxizität	1979: 118,0 201,0 1980: 63,0 1981: 20,0	01.01.79 - 31.12.81

KENN- ZEICHEN	DURCHFÜHRENDE STELLE VORHABENLEITER	THEMA	FÖRDERSUMME IN TDM JAHR GESAMT		LAUFZEIT
03 7234	Universität Hamburg K. LILLELUND	Entwicklung und Erprobung eines Fischtestes im Durch- fluß zur Quantifizierung der Bioakkumulation	1979: 66,4 1980: 104,9 1981: 116,8 1982: 13,0	301,1	01.01.79 - 31.03.82
03 7202	Landesanstalt für Um- weltschutz, Karlsruhe W.K. BESCH	Akute und chronische Effekte von ausgewählten Substanzen der "schwarzen Liste" der EG auf repräsentative Süßwasser- organismen	1978: 23,0 1979: 37,5 1980: 63,7	124,2	01.10.78 - 30.04.81
03 7219	Universität Heidelberg G. MÜLLER	Untersuchungen zum Sorptions- und Remobilisierungsverhalten von Chemikalien in künstlichen und natürlichen Sedimenten	1979: 186,0 1980: 75,0 1981: 75,0	336,0	01.01.79 - 31.12.81
03 7235	Bundesgesundheitsamt Berlin W. NIEMITZ/P. HANSEN	Nutzbarmachung künstlicher Ge- wässeranlagen für die Ökotoxi- kologische Prüfung von Chemi- kalien	1979: 124,7 1980: 78,0 1981: 85,7 1982: 27,6	316,0	01.05.79 - 30.04.82

3.2 Thematische Übersicht

Kenn- zeichen	Problemstellung	(Referenz-) Chemikalien	Seite
03 7207	Vergleichende Untersuchungen von Testsystemen zur Prüfung der Abbaubarkeit von Chemikalien, aerobe Bedingungen	Nitrophenole, Anilin, LAS + 40 weitere org. Chemikalien	8
03 7221	Abbauverhalten von organischen Chemikalien unter anaeroben Bedingungen	Phenol, Anilin, p-Chloranilin, 2,4-D Methanol, Nitrophenole, Saccharide	20
03 7244	Physiologische und pathologische Veränderungen bei Karpfen als Indikatoren für Umweltbelastungen	HCB, DDT, Harnstoff, Phenol, PCP, Atrazin, Methanol, Chloroform	42
03 7211	Messung der sublethalen Wirkung von Chemikalien auf das Schwimmverhalten mehrerer Fischarten in einem Durchflußsystem, Akkumulations- und Eliminationsverlauf	γ -HCH	64
03 7234	Testsystem zur Prüfung der Bioakkumulation und Elimination mit verschiedenen Fischarten im Durchfluß, Messung der Schadstoffverteilung in Organen, Biokonzentrationsfaktoren	γ -HCH, HCB, PCP, DOP, Trichloräthylen, 1,2,4-Trichlorbenzol	74
03 7202	Akute und chronische Effekte auf Webaktivität und Netzbau von Wasserspinnen	HgCl ₂ , Phenol, Trichloräthylen	95
03 7219	Bindung und Anreicherung von Chemikalien in Sedimenten, System Wasser-Sediment und System Sediment-Tubificidae	Benzo(a)pyren	111
03 7235	Limnologische Untersuchungen der biologischen Entwicklung in verschiedenen künstlichen Gewässeranlagen ohne Chemikalienzugabe	--	127

Der Bundesminister für Forschung und Technologie

Abschlußbericht für das Projekt 03 7207
Einzelvorhaben Nr. 27

Untersuchungen im Hinblick auf ein Testsystem
zur Prüfung der Abbaubarkeit von Chemikalien
unter den Aspekten Oberflächenwasser und
Kläranlage

von

Dr. W.K. Fischer

Dr. Peter Gerike

Henkel KGaA, Hauptabteilung Ökologie
Düsseldorf

Hauptabteilungsleiter:
Dr. W.K. Fischer

Projektleiter:
Dr. P. Gerike

Februar 1981

Untersuchungen im Hinblick auf ein Testsystem zur Prüfung der Abbaubarkeit von Chemikalien unter den Aspekten Oberflächenwasser und Kläranlage

Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes wurden folgende Teilthemen behandelt:

- Drei Kohlenstoffanalysengeräte wurden bez. Richtigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit überprüft. Es zeigte sich, daß Abbaubarkeitsprüfungen im OECD Screening Test mit Anfangskonzentrationen entsprechend ≥ 5 mg/l C analytisch möglich sind.
- Eine Vorschrift für den Modifizierten OECD Screening Test wurde vorgelegt. Der Test wird Teil des Anhang V zur 6. Änderungsrichtlinie (d.h., des Europäischen Chemikaliengesetzes) sein. Die Vorschrift befindet sich z.Zt. noch in einer EG-internen redaktionellen Überarbeitung.

Der Test wurde im Rahmen dieses Projektes auf Reproduzierbarkeit überprüft. Obwohl er sich nach rein statistischen Gesichtspunkten noch nicht als optimal erwies, ist er für den vorgesehenen Zweck der Feststellung der "ready biodegradability" geeignet.

- Neben dem Modifizierten OECD Screening Test wurden sieben weitere wichtige Abbaubarkeitstests anhand der Prüfung von 44 Verbindungen bezüglich der Aussage ihrer Ergebnisse charakterisiert. Die Unterteilung der Tests in solche auf "ready" und "inherent biodegradability" und Simulationstests, wie sie von der OECD Expertengruppe "Abbau/Akkumulation" empfohlen wurde, basiert auf dieser Korrelationsstudie.

Investigations with respect to a test system for biodegradability evaluations under the aspects of surface waters and sewage treatment plants

Summary

In the course of this project the following aspects were treated:

- Three carbon analyzers were investigated with respect to correctness, reproducibility and sensitivity. It was shown, that biodegradability evaluations in the OECD Screening Test are analytically possible with starting concentrations corresponding to ≥ 5 mg/l C.
- A procedure for the Modified OECD Screening Test was made available. Since the test will be part of annex V of the sixth amendment to the 1967 directive (i.e., the European Chemicals Law) the procedure is presently being worked over editorially within the EEC.

As a part of this project the test was evaluated with respect to reproducibility. Although it is not optimal yet from a purely statistical viewpoint, it proved adequate for the intended purpose of determining "ready biodegradability".

- Besides the Modified OECD Screening Test seven other important biodegradability tests were characterized with respect to their relevance on the ground of the results obtained with 44 compounds. The division of the tests into those for "ready" and "inherent biodegradability" and simulation tests as it has been recommended by the OECD Expert Group "Degradation/Accumulation" is based on this correlation study.

Das Gesamtprojekt beinhaltet die folgenden Teilthemen:

- 1.0 Präzisierung der Kohlenstoffanalytik betr. Richtigkeit, Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit für Abbaubarkeitsprüfungen im Modifizierten OECD Screening Test.
- 2.0 Modifizierter OECD Screening Test
 - 2.1 Entwicklung der Methodik und Erstellung einer Testvorschrift
 - 2.2 Reproduzierbarkeitsstudie im Modifizierten OECD Screening Test
- 3.0 Die Charakterisierung wichtiger Abbaubarkeitstests durch eine Korrelationsstudie.

Die Untersuchungsergebnisse werden unten in der angegebenen Reihenfolge diskutiert.

1.0 Kohlenstoffanalytik

Drei Kohlenstoffgeräte (Tab. I)

Tab. I

Gerät	Oxidations- Prinzip	Detektion	Proben
Beckman 915	Luft/Kat./ Temp.	IR	50 µl
Oceanography	Peroxydisul- fat 2 h'/130 °C (Ampulle)	IR	bis 7 ml
Maihak UV-DOC	UV-Licht/ O ₂ (O ₃)	IR	bis 20 ml

wurden bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit untersucht. In bidestilliertem Wasser wurden die in Tab. 2 aufgeführten Nachweisgrenzen bestimmt:

Tabelle 2

TOC-Gehalt bidest.H₂O, Nachweisgrenze von TOC/DOC-Geräten mg/l org. C .

	Beckman 915	Oceanography	Maihak UV-DOC
\bar{x}	0,54	0,25	0,09
s	$\pm 0,11$	$\pm 0,033$	0,009
VK rel %	21,0	13,2	9,3
Nachweisgrenze *	0,48	0,14	0,04
n	15	16	12
n ohne Ausreißer	15	13	9

* Nachweisgrenze = $3 \cdot \sqrt{2} s_{B1}$

Die Standardabweichungen ergaben als Maß für die Reproduzierbarkeit die Reihenfolge: Beckman, Oceanography, Maihak.

Die Wiederfindung ist geräte- und substanzabhängig, wobei eine klare Abhängigkeit vom Gerät, Substanz und C-Konzentration in der Probe nicht erkennbar ist.

Insgesamt erwies sich das Maihak-Gerät für lösliche Substanzen als das leistungsfähigste, gefolgt vom Oceanography- (nur Naßverbrennungsteil) und Beckman-Gerät, jedoch erlaubt das Beckman-Gerät einen fast doppelt so hohen Probendurchsatz wie das Maihak-Gerät.

Alle drei Geräte sind für Abbaubarkeitsbestimmungen im Modifizierten OECD Screening Test bei Anfangskonzentrationen von ≥ 5 mg/l C geeignet. Keck und Grunwald¹ haben dieses Anwendungsgebiet detailliert diskutiert.

2.0 Der Modifizierte OECD Screening Test

2.1 Entwicklung der Methodik und Erstellung einer Testvorschrift

Die Entwicklung der Methodik erfolgte in enger Anlehnung an die Diskussionen der OECD Expertengruppe "Abbau/Akkumulation" ². Dadurch wurde z.B. der Test von den ursprünglichen 19 auf jetzt 28 Tage verlängert, und die zunächst vorgesehene Kontrollsubstanz Hydrochinon durch Anilin ersetzt.

Da die Methode Teil des Anhangs V, d.h. des Methodenteils für die Stufe 0 der 6. Änderungsrichtlinie zur 67er Richtlinie (d.h., dem Europäischen Chemikaliengesetz) ³ und der entsprechenden Rechtsverordnung zum deutschen Chemikaliengesetz ⁴ sein wird, befindet sie sich z.Zt. EG-intern in einer letzten redaktionellen Überarbeitung ⁵. Auch die OECD-Fassung ⁶ wird z.Zt. noch einmal redaktionell überarbeitet. Sachliche Änderungen sind jedoch nicht mehr zu erwarten.

2.2 Reproduzierbarkeitsstudie zum Modifizierten OECD Screening Test

Eine eigentlich unabdingbare Voraussetzung für einen Test, dessen Ergebnisse eine Grundlage für gesetzliche Maßnahmen bilden, ist, daß er reproduzierbare Ergebnisse liefert. Deshalb wurde, sozusagen als Vorübung für einen weitgestreuten Ringtest, eine Reproduzierbarkeitsstudie innerhalb unseres geübten Labors durchgeführt. Diese Reproduzierbarkeitsstudie, die nach Gesichtspunkten der statistischen Ringtestauswertung angelegt und ausgewertet wurde ⁷, definiert besonders gut die Aussagemöglichkeiten eines Testverfahrens.

Als Testsubstanzen wurden Tetrapropylenbenzolsulfat (TBS), lineares Alkylbenzolsulfat (LAS) und Hydrochinon ausgewählt. Diese Substanzen sind biologisch weder völlig hart (TBS) noch völlig weich (LAS, Hydrochinon) und damit für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit besonders geeignet.

Es zeigte sich, daß der Modifizierte OECD Screening Test für den vorgesehenen Zweck der Feststellung der "ready biodegradability" eine genügende Reproduzierbarkeit besitzt, daß aber unter rein statistischen Gesichtspunkten nicht immer homogene Datensätze erhalten werden.

Der geschlossene Flaschentest nach Fischer war zuvor ebenfalls unter diesem Aspekt untersucht worden und hatte unter rein statistischen Gesichtspunkten eine bessere Reproduzierbarkeit gezeigt⁸. Z.Zt. wird untersucht, ob die Zugabe einer zusätzlichen, gut abbaubaren Kohlenstoffquelle zur mineralischen Nährlösung des OECD Screening Tests u.a. auch zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit führt. (Diese Untersuchungen sind nicht Teil des hier beschriebenen Projektes).

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie im Modifizierten OECD Screening Test sind in einem Projekt-Zwischenbericht⁹ zusammengefaßt und diskutiert worden.

3.0 Die Charakterisierung wichtiger Abbaubarkeitstests durch eine Korrelationsstudie

Um Möglichkeiten der internationalen Testharmonisierung bzw. der gegenseitigen Testergebnisanerkennung im Rahmen nationaler und internationaler Chemikaliengesetzgebungen aufzuzeigen, wurden 44 Verbindungen, die ein Spektrum chemischer, physikalischer und biologischer Eigenschaften abdecken, in acht wichtigen Tests geprüft:

- Coupled Units Test (Modif. OECD Confirmatory Test)
- Modifizierter OECD Screening Test
- Geschlossener Flaschentest nach Fischer
- AFNOR-T90-302-Test
- Sturm-Test
- MITI-Test (Japan)
- Zahn-Wellens-Test
- US-EPA-Activated Sludge Test

Die Verbindungen wurden zunächst in den verschiedenen Tests geprüft und die übereinstimmenden Ergebnisse "aus-sortiert". Wenn aber eine Verbindung in einem Test abgebaut wurde, in einem anderen aber nicht, so wurde der erste Test dem zweiten als Voradaptationsschritt vorgeschaltet. Aufgrund der etwa 360 Abbaubarkeitsbestimmungen, die im Rahmen dieses Teilprojektes durchgeführt wurden, war eine gute Charakterisierung der einzelnen Tests und darüberhinaus die Erstellung einiger wichtiger Prinzipien, die bei Abbaubarkeitsbewertungen beachtet werden sollten, möglich.

3.1 Charakterisierung der einzelnen Tests

- Der Geschlossene Flaschentest nach Fischer:
Dieser arbeitsökonomische Test mit hoher Kapazität differenziert strukturbezogen sehr stark und liefert im Umweltsinne verlässliche positive Substanzbewertungen.
- Der Modifizierte OECD Screening Test ergibt ebenfalls im Umweltsinne verlässliche positive Substanzbewertungen, ohne allerdings so streng wie der Geschlossene Falschentest zu sein.
- Der Sturm-Test, der nach seinem Prinzip ein Mineralisierungstest ist, erwies sich als. erstaunlich hoch bewertend, manchmal, z.B. im Falle der Sulfanilsäure, als im Sinne der praktischen Umweltgegebenheiten zu hoch bewertend.

Der Grund für die relative "Stärke" des Tests liegt offenbar in dem dazugehörigen Voradaptationsschritt, dessen Umweltrelevanz nicht einfach zu gewichten ist.

-- Der AFNOR T90-302-Test:

mit der konventionellen Testdauer von 42 Tagen ist bei nicht hemmenden Substanzen ein recht "kräftiger" Test, der in einigen Fällen im Sinne der Umweltanforderungen sogar überzubewerten scheint. Auf der anderen Seite ist er überaus empfindlich gegenüber hemmenden und toxischen Substanzen, vor allem wegen der vergleichsweise hohen Testkonzentration. Der vorgeschriebene begleitende Hemmtest erfüllt offensichtlich seine Kontrollfunktion nicht, da er selbst auf Desinfektionsmittel nicht anspricht.

-- Der MITI-Test:

ergibt im Umweltsinne verlässliche positive Substanzbeurteilungen. Der Test ist sehr streng. Die sehr aufwendige Vorbereitung der Impfung erfüllt offensichtlich nicht den beabsichtigten Zweck, das gesamte in der Umwelt vorhandene Abbaupotential in diesem Test zu vereinen.

-- Der Zahn-Wellens-Test

ist nicht bei allen positiven Substanzbewertungen als im Umweltsinne sicher zu erachten.

-- Der EPA-Activated Sludge Test

ist der am stärksten überbewertende Test. Erwiesenermaßen in der Umwelt ungenügend abbaubare Substanzen wie TBS wurden in diesem Test hoch abgebaut.

-- Die Bilanzierung im OECD Confirmatory Test ergibt im Umweltsinne verlässliche Substanzbeurteilungen. Der Test ist unerlässlich für die praxisnahe Prüfung von Problemsubstanzen, z.B. toxischen oder abbauhemmenden. Der vergleichsweise gute Modellcharakter für eine

kommunale Belebungsanlage verleiht den in diesem Test erarbeiteten Ergebnissen ein besonderes Gewicht.

3.2 Prüfprinzipien

-- Die Empfehlung der OECD Experten Gruppe "Abbau/Akkumulation" für eine Gruppe von Tests, die zur Feststellung der "ready biodegradability" geeignet sind, wird durch unsere experimentellen Ergebnisse ohne jede Einschränkung unterstützt:

- Geschlossener Flaschentest (28 Tage)
- Modifizierter OECD Screening Test (28 Tage)
- Modifizierter AFNOR T90-302-Test (28 Tage)
- Sturm-Test ohne Voradaptation (28 Tage)
- MITI-Test (14 Tage)

Nach dem heutigen Stand des Wissens liefern alle diese Tests im Umweltsinne sichere positive Substanzbewertungen, d.h., es sind keine falsch positiven, wohl aber falsch negative Ergebnisse zu erwarten. Die Anwendung eines jeden dieser Tests sollte möglich sein, bzw. Ergebnisse aus diesen Tests können gegenseitig anerkannt werden.

- Weitere Maßnahmen wie Voradaptationsschritte und längere Testzeiten liefern zwar wertvolle zusätzliche Informationen, sollten aber in der ersten Prüfstufe keine Anwendung finden.
- "Stärkere" Tests wie der Zahn-Wellens-Test und der US EPA Activated Sludge Test wurden von der OECD Experten Gruppe "Abbau/Akkumulation" richtigerweise zu der besonderen Gruppe der Tests auf "inherent biodegradability" zusammengefaßt. Bei ihnen können falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieses Teilprojektes sind in Zwischenberichten und Veröffentlichungen zusammengefaßt.¹⁰⁻¹²

Literatur

1. E. Keck und U. Grunwald, Erfahrungen mit der Bestimmung kleiner TOC/DOC-Konzentrationen bei biologischen Versuchen. Vom Wasser 53 (1979) 85-95 und 2. Forschungszwischenbericht für das Projekt 03 7307, Einzelvorhaben Nr. 27, Juni 1979
2. OECD-Chemicals Testing Programme, Expert Group Degradation/Accumulation, Draft Final Report, Vol. I, Umweltbundesamt, Berlin, Dec. 1979
3. Richtlinie des Rates vom 18. Sept. 1979 zur sechsten Änderung der Richtlinie 67/548/EWG zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe (79/831/EWG, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. 2 259/10
4. Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Chemikaliengesetz - Chem.-G) vom 16. Sept. 1980, Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1980, Teil I, S.1718
5. EEC Directive 79/831, Annex V, Part C: Methods for the Determination of Ecotoxicity, 5.2 Degradation, Biotic Degradation: Modified OECD Screening Test
6. OECD Chemicals Testing Programme, Expert Group C Degradation/Accumulation, C 118/79/Int., Modified OECD Screening Test with DOC Analysis Dec. 1979
7. G. Gottschalk und R.E. Kaiser, Einführung in die Varianzanalyse und Ringversuche, BI Taschenbuch 775, Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich, 1976
8. P. Gerike, K. Richterich und H.J. Grebe, Eine Reproduzierbarkeitsstudie im Geschlossenen Flaschentest, Henkel-interner Arbeitsbericht 1980/1919 vom 1.9.1980 (Veröffentlichung in Vorbereitung)

9. P. Gerike und K. Richterich, Eine Reproduzierbarkeitsstudie im Modifizierten OECD Screening Test. 4. Forschungszwischenbericht für das Projekt 03 7207, Einzelvorhaben Nr. 27, Februar 1981
10. P. Gerike und W.K. Fischer, A Correlation Study of Biodegradability Determinations with Various Chemicals in Various Tests, Ecotoxicology and Environmental Safety 3 (1979) 159-173 und 1. Forschungszwischenbericht für das Projekt 03 7207, Einzelvorhaben Nr. 27, Februar 1979
11. P. Gerike und W.K. Fischer, A Correlation Study of Biodegradability Determinations with Various Chemicals in Various Tests, II. Additional Results and Conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, im Druck und 3. Forschungszwischenbericht für das Projekt 03 7207, Einzelvorhaben Nr. 27, Februar 1980
12. P. Gerike und P. Wierich, The Value of Biodegradability Test Results for Predicting the Fate of Chemicals in the Environment, Proceedings of the IAES-SECOTOX-Symposium "Principles for the Interpretation of the Results of Testing Procedures in Ecotoxicology", Sept. 30-Oct. 2., 1980, Sophia-Antipolis, Frankreich, im Druck

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7221)

Entwicklung und Erprobung einer Methode zur Untersuchung
des Abbauverhaltens von organischen Substanzen
unter anaeroben Milieubedingungen

von

Prof. Dr.-Ing. R. Wagner

und

Dipl.-Chem. H.-J. Bräutigam

Institut für Siedlungswasserbau,
Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität
Stuttgart

Institutsleiter:

Prof. Dr.-Ing. K.-H. Hunken

Februar 1981

Inhalt

=====

1. Einleitung
2. Anaerober Abbau von organischem Material
3. Arbeitsweise
 - 3.1. Versuchsdurchführung
 - 3.2. Auswertung
4. Untersuchungsergebnisse
 - 4.1. Untersuchungsergebnisse mit Sacchariden
 - 4.2. Untersuchungsergebnisse von Chemikalien der Referenzliste
5. Literatur

Kurzfassung

=====

Die Untersuchungsmethode besteht darin, daß eine unter Standardbedingungen vorkultivierte Faulmatrix mit systematisch steigenden Mengen an Prüfsubstanz versetzt und 21 bis 28 Tage bei 30°C unter ständiger Umwälzung anaerob behandelt wird. Währenddessen wird in regelmäßigen Zeitabständen die produzierte Gasmenge und deren Zusammensetzung bestimmt. Aus der Hemmung bzw. Verstärkung der Gasentwicklung wird auf die toxische Wirkung bzw. anaerobe Abbaubarkeit der Prüfsubstanz geschlossen. Nicht-modifizierte Kohlenhydrate (Glucose, Maltose, Cellulose, Stärke) erwiesen sich als anaerob gut abbaubar. Chemisch modifizierte Polysaccharide (Carboxymethylstärke, Carboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose) zeigten, daß deren anaerober Abbau mit steigendem Veretherungsgrad zunehmend erschwert ist. Von den untersuchten Referenzchemikalien erwiesen sich Anilin, 4-Chloranilin, Dichlorphenoxyessigsäure, 2-Nitrophenol und 4-Nitrophenol als anaerob nicht abbaubar. Darüberhinaus verhielten sich 2-Nitrophenol und 4-Nitrophenol stark toxisch. Methanol und Phenol wurden jeweils nach einer Anlaufphase anaerob abgebaut.

Summary

=====

Development and proof-testing of a method for
assaying the bio-degradability of organic
substances under anaerobic milieu conditions.

The test is carried out by precultivating anaerobic digestion media under standardized conditions, adding systematically increasing amounts of the test substance to them and then treating the resulting mixtures anaerobically at 30°C for 21 to 28 days under steady agitation. During the test period the amount of gas generated and its composition are determined. Conclusions as to the toxic effects or anaerobic biodegradability of the test substance are arrived at by considering the extent to which gas generation is inhibited or enhanced resp. Non-modified carbohydrates (glucose, maltose, cellulose, starch) proved themselves to be easy to degrade anaerobically. Chemically modified polysaccharides (carboxymethyl starch, carboxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose) gave results indicating that with increasing degrees of etherification their anaerobic biodegradation is rendered increasingly difficult. From the reference chemicals tested, aniline, 4-chloroaniline, dichlorophenoxy acetic acid, 2-nitrophenol and 4-nitrophenol proved themselves to be anaerobically non-biodegradable. Moreover 2-nitrophenol and 4-nitrophenol acted as strongly toxic agents. Both methanol and phenol were subject to anaerobic bio-degradation after a lag-phase.

1. Einleitung

Als charakteristisches Endprodukt des mikrobiellen anaeroben Abbaus von organischem Material wird — neben Zellmaterial, humusähnlichen Stoffen und Kohlendioxid — Methan gebildet.

Pro Jahr werden auf diese Weise ca. $(0,5 - 1,0) \cdot 10^9$ Tonnen $[(31 - 62) \cdot 10^6 \text{ Mmol}]$ Methan an die Atmosphäre abgegeben (1). Verglichen mit der jährlich photosynthetisch umgesetzten Kohlendioxidmenge von $60 \cdot 10^9$ Tonnen $[1,4 \cdot 10^9 \text{ Mmol}]$ ist dies zwar recht bescheiden, doch darf nicht übersehen werden, daß zum einen das wahre Ausmaß dieser mikrobiellen Tätigkeit durch methanoxidierende Bakterien verdeckt wird und zum anderen in verschiedenen Kompartimenten (z. B. Fluß- und Seensedimenten, Meeresböden, Tundren, Faulräumen von Kläranlagen, Mülldeponien ...) der Abbau von organischem Material ausschließlich auf diesem Wege erfolgt und z. T. von wirtschaftlicher Bedeutung ist. So ist beispielsweise der anaerobe Abbau von Primär- und Überschußschlamm in der Abwasserreinigung der einzige energieliefernde Verfahrensschritt. Nicht zuletzt aus diesem Grunde hat der anaerobe Abbau von organischem Material in den letzten Jahren steigendes Interesse gefunden. Auch die Mikrobiologie hat sich intensiv und mit Erfolg vor allem mit dem Phänomen der Methanbildung auseinandergesetzt. Ausführliche Übersichtsartikel finden sich z. B. in (2,3).

Im Gegensatz zur Verfahrenstechnik der Schlammfaulung und zur Mikrobiologie der methanbildenden Bakterien (Methanogens) wurde das anaerobe Abbauverhalten von organischem Material (z. B. von synthetischen organischen Substanzen) nur sporadisch untersucht.

Die Ursache hierfür dürfte unter anderem das Fehlen einer Untersuchungsmethode sein, die einerseits verschiedene Grundregeln bei der Durchführung beachtet und andererseits mit vertretbarem experimentellem Aufwand durchgeführt werden kann.

Beispielsweise stellt der in zwei kürzlich erschienenen Arbeiten (4,5) vorgeschlagene bzw. praktizierte Einsatz von synthetischen Nährlösungen eine zu starke Vereinfachung der natürlichen Milieubedingungen dar. Die Erkenntnis, wonach unter aeroben Verhältnissen, die Matrix das abbaukinetische Verhalten von Substanzen mitbestimmt und damit die unmittelbare Übertragung der mit einer synthetischen Nährlösung gewonnenen Ergebnisse auf natürliche Verhältnisse in aller Regel zu Fehlbeurteilungen führt (6), dürfte auch für entsprechende anaerobe Abbauuntersuchungen gelten. Darüberhinaus ist i.a. die Auswertetechnik unzureichend.

Dagegen berücksichtigt die im folgenden kurz vorgestellte Arbeitsweise alle Gesichtspunkte, wie sie allgemein bei der Durchführung eines biologischen Abbautests zu beachten sind und beispielsweise bei der respirometrischen Verdünnungsmethode im aeroben Bereich Anwendung finden (7):

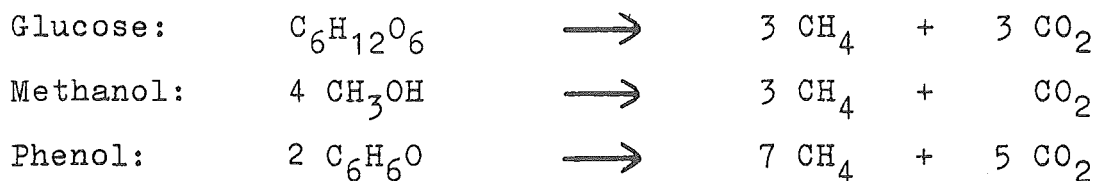
Die Variation der Testsubstanzkonzentration führt zur Erkennung konzentrationsabhängiger Hemm- und Giftwirkungen. Durch den Einsatz natürlicher Bakterienmischpopulationen und die zusätzliche Anwesenheit eines gut abbaubaren Nährsubstrates (Substratkonkurrenz) werden Versuchsbedingungen geschaffen, die eine weitgehende Übertragung der Versuchsergebnisse auf die Praxis ermöglichen.

Außerdem erfolgt die mathematische Auswertung der Meßergebnisse unter Berücksichtigung statistischer Gesichtspunkte, auf die bei der Meßdatenauswertung heutzutage nicht mehr verzichtet werden sollte, da zur Bewältigung der dafür notwendigen Rechenarbeit entsprechende programmierbare Taschenrechner bzw. Kleincomputer zur Verfügung stehen.

2. Anaerober Abbau von organischem Material

Als Endprodukt des anaeroben Abbaus, an dem verschiedene Bakteriengruppen beteiligt sind, wird der Kohlenstoff des organischen Materials über eine Reihe von Zwischenstufen schließlich in Bakterienmasse, humusähnliche Stoffe, Kohlendioxid und Methan umgesetzt.

Formal chemisch gesehen handelt es sich um eine Disproportionierung, bei der Kohlenstoff einer mittleren Oxidationsstufe zu einem Teil in die höchste (CO_2) und zu einem anderen Teil in die niedrigste Oxidationsstufe (CH_4) überführt wird. Thermodynamisch möglich ist z. B. der anaerobe Abbau von folgenden Substanzen:



Die zur Methanbildung notwendigen Reduktionsäquivalente können dabei durchaus auch von anderen anwesenden Kohlenstoffverbindungen (z. B. Nährsubstrat) geliefert werden, wie Abbauuntersuchungen von ^{14}C -markiertem Methanol in An- und Abwesenheit von Acetat gezeigt haben (8), und wodurch eigene Untersuchungsergebnisse mit ^{14}C -(U)-Glucose zwanglos gedeutet werden können. Gemäß den obigen Disproportionierungsgleichungen müßte z. B. eine Mischung aus nährsubstrathaltigem Faulschlamm und Methanol verglichen mit einer Nullprobe eine zusätzliche Menge Methan bilden, die 75% des Methanol-Kohlenstoffgehaltes entspricht (bzw. 50% bei Glucose oder Maltose und 58,3% bei Phenol).

Da ein gewisser Prozentsatz auch zum Aufbau von Zellmaterial benötigt wird, sind im Versuch etwas niedrigere Werte zu erwarten.

3. Arbeitsweise

3.1. Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung des anaeroben Abbauverhaltens von organischen Substanzen werden unter Anwendung der Ergänzungsmethode (7) verschiedene abgemessene Anteile der in Wasser gelösten Testsubstanz mit Faulschlamm, dem zusätzlich ein gut abbaubares Nährsubstrat (Weizenkleie/Fischmehl) zugefügt wurde, jeweils zu einem gleichbleibenden Volumen ergänzt und nach Spülen des Reaktionsgefäßes mit Stickstoff bei konstanter Temperatur (30°C) und unter stetigem Rühren 21 Tage sich selbst überlassen. Während des Abbauversuches wird die gebildete Gasmenge und die Gaszusammensetzung jeweils nach verschiedenen Zeiten gleichzeitig in den einzelnen Versuchsaapparaturen gemessen. Die Auswertung erfolgt im wesentlichen anhand der gebildeten Methanmenge.

In Abbildung 1 ist schematisch die Versuchsaapparatur, bestehend aus Reaktionsgefäß, Eudiometerrohr für die Aufnahme des gebildeten Faulgases mit Niveaugefäß, einschließlich Mischvorrichtung zur Faulgasprobenvorbereitung und die analytische Meßeinheit (Gaschromatograph) dargestellt.

Die Versuchsaapparatur ist eine Weiterentwicklung der Apparatur, wie sie vom Arbeitskreis für Untersuchungsverfahren für Schlamm und feste Abfallstoffe der Fachgruppe Wasserchemie in der GDCh als Testaapparatur empfohlen wird.

Die ständige Umwälzung der Faulschlamm suspension erfolgt durch ein eingehängtes, speziell für diese Untersuchungen entwickeltes Rührwerk, das durch einen rotierenden Magneten von außen angetrieben wird und sich gut bewährt hat.

Die Gasanalyse erfolgt nach vorheriger Trocknung des Faulgases mittels Phosphor pentoxid (Sicapent). Hierdurch beträgt die Analysenzeit für H_2 , N_2/O_2 , CH_4 und CO_2 nur zwei Minuten.

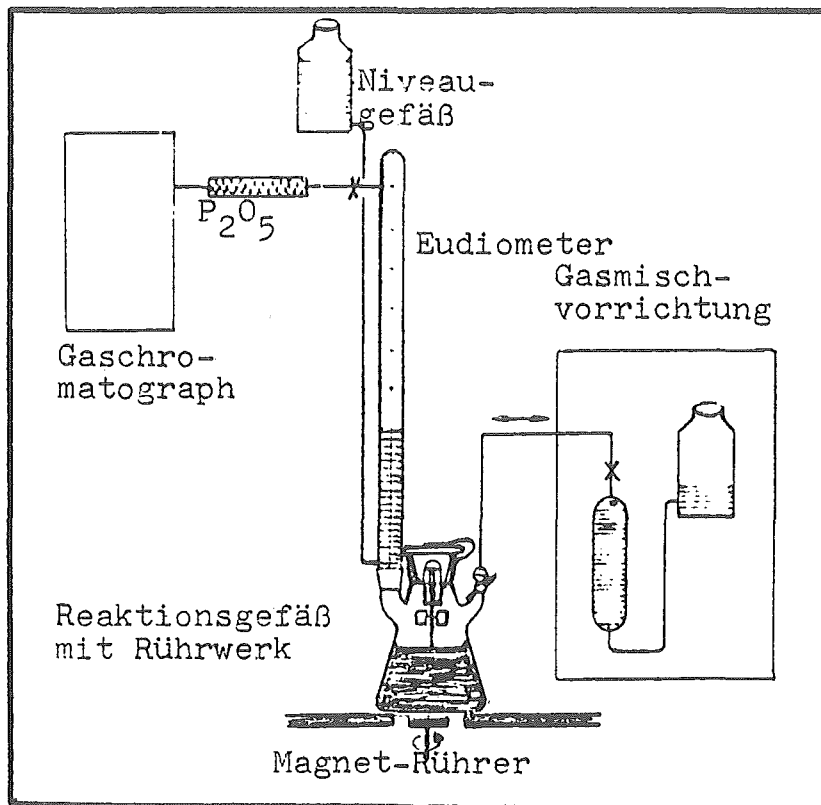


Abb.1: Versuchseinrichtung zur Untersuchung des anaeroben Abbauverhaltens von organischen Substanzen.

3.2. Auswertung

Bei der Auswertung der Meßdaten werden die Mischungen aus der Faulmatrix und der Testsubstanzlösung als binäres System betrachtet, bei dem aus dem Untersuchungsergebnis der verschiedenen Mischungen (jeweils kumulativ gebildete Methanmenge) nach den Regeln der Additivität auf den Beitrag der Einzelkomponenten geschlossen wird. Auf eine ausführliche Beschreibung der mathematischen Zusammenhänge wird in diesem Rahmen verzichtet unter Verweis auf die entsprechenden Veröffentlichungen (9,10,11).

Die Auswertung erfolgt in Abhängigkeit vom Abbauverhalten der Testsubstanz in 4 Schritten:

1. Auswertung der Rohmeßdaten
2. Additivitätskontrolle

bei abbaubaren Substanzen zusätzlich:

3. Ausgleichsrechnung (linear bzw. nichtlinear)
4. Kinetische Auswertung

Die Darstellung des Untersuchungsergebnisses erfolgt bei Testsubstanzen, die sich im Versuchszeitraum als toxisch oder persistent erwiesen haben, anhand von Diagrammen, die die Konzentrationsabhängigkeit des Abbauverhaltens beschreiben. Bei abbaubaren, definierten Substanzen wird die durch Ausgleichsrechnung ermittelte, aus der Testsubstanzlösung gebildete Methanmenge in Relation zum theoretischen Wert gesetzt, wie dieser aus dem Kohlenstoffgehalt der Testsubstanz und deren Konzentration in der Testlösung leicht errechnet werden kann. Liegt die Testsubstanz nicht definiert vor (z. B. Schlamm) wird auf deren experimentell bestimmten Kohlenstoffgehalt ausgewertet.

4. Untersuchungsergebnisse

Zur Erprobung der Methode wurden zunächst verschiedene Mono-, Di- und Polysaccharide, sowie einige chemisch modifizierte, technisch wichtige Polysaccharide als Testsubstanzen eingesetzt.

Darüberhinaus wurden folgende Referenzchemikalien untersucht:

Anilin, 4-Chloranilin, Phenol, Methanol, 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

4.1. Untersuchungsergebnisse mit Sacchariden

Als charakteristisches Beispiel für eine sehr gut anaerob abbaubare Testsubstanz wurden in Abbildung 2 die Versuchsergebnisse von Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, rel. Molmasse 360,32) graphisch dargestellt.

Die Konzentration der Testsubstanz in der Lösung, mit der die Mischungen hergestellt wurden, betrug 10 g/l. Damit können unter Normalbedingungen (760 Torr, $0^\circ C$) maximal 7464,7 ml Faulgas gebildet werden, wobei der Methananteil theoretisch 50% betragen sollte.

Die Konzentration der Testsubstanz in den 10 Mischungen (Volumen jeweils 400 ml) lag, in arithmetischer Abstufung von jeweils 0,25 g, zwischen 0 und 2,25 g/l.

Das obere Diagramm beschreibt für einige ausgewählte Versuchszeiten die Konzentrationsabhängigkeit, das untere die Zeitabhängigkeit (Kinetik) des anaeroben Abbaus der Testsubstanz Maltose zu Methan.

Im Konzentrationsdiagramm sind die Steigungen der Punktfolgen bei geradlinigem Verlauf, bzw. bei gekrümmtem Verlauf der Wert für $V \rightarrow 0$ ein Maß für den Abbau der Testsubstanz zu Methan. Zunehmende Steigung bedeutet zunehmender Abbau. Der Verlauf der Punktfolgen zeigt, daß sich die Methanbildung in den ersten Versuchstagen nur im Bereich hoher Verdünnungen (geringe Testsubstanzkonzentrationen) additiv verhält. Dies bedeutet, daß die Anwesenheit von Maltose in den höheren Konzentrationsbereichen zunächst die Abbaukapazität überfordert; mit längerer Versuchsdauer nimmt jedoch diese Kapazität des Systems zu.

Ein ähnliches Verhalten zeigten auch andere Saccharide (z. B. Glucose, Xylose, Raffinose, Stärke) und Methanol. Da die Steigungen der jeweils zusammengehörenden Punktfolgen bereits nach etwa 4 Tagen kaum noch zunehmen, ist der Abbau der Testsubstanz in allen Mischungen offenbar bereits nach dieser Zeit weitgehend abgeschlossen, ein Zeichen für die gute anaerobe Abbaubarkeit von Kohlenhydraten.

Die quantitative Auswertung des oberen Diagramms mittels Ausgleichsrechnung und die Auftragung der Werte für die Steigungen und die Achsenabschnitte vermitteln im unteren Diagramm einen Einblick in die Abbaukinetik der Testsubstanz und der Matrix und macht somit den im oberen Diagramm bereits qualitativ erkennbaren Abbauverlauf der Testsubstanz quantitativ, statistisch abgesichert, sichtbar.

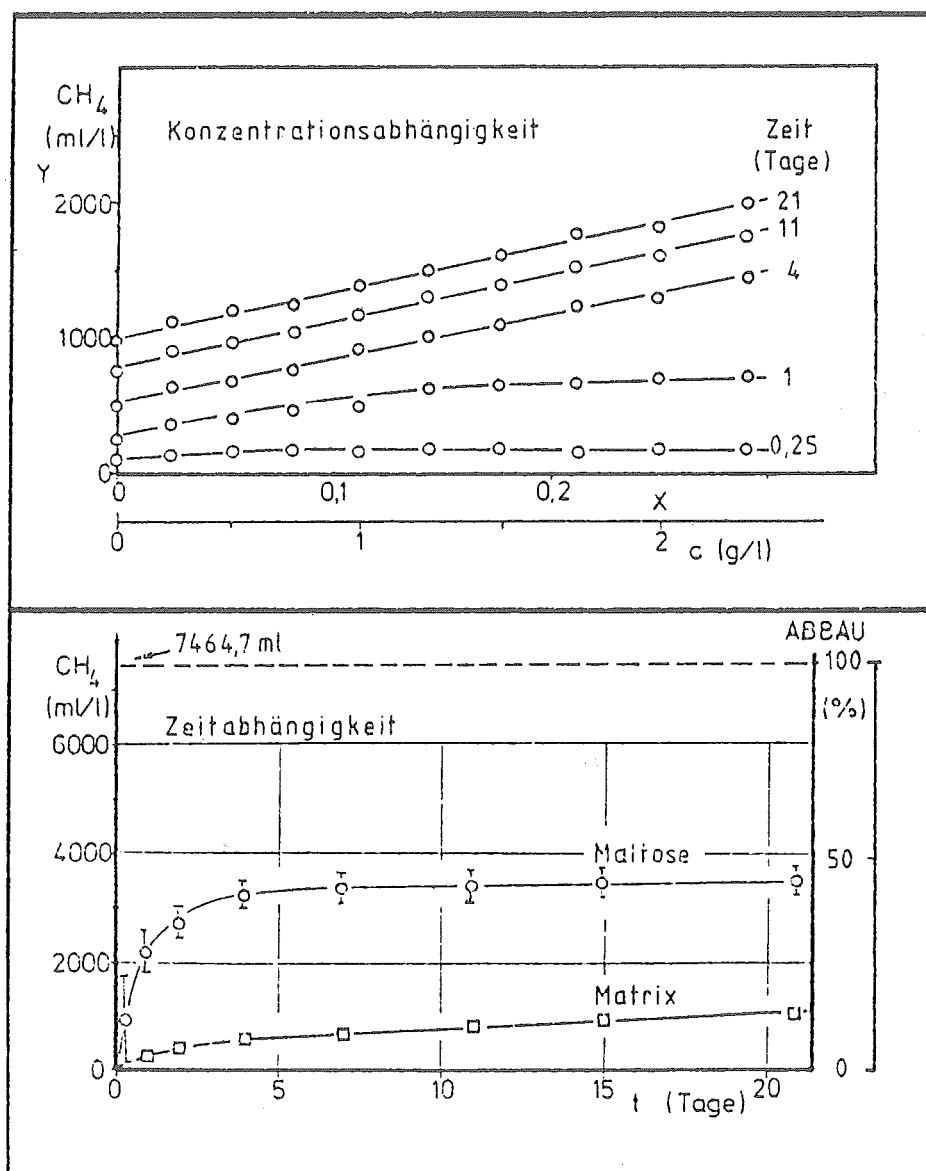


Abb.2: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des anaeroben Abbaus von Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$).
Parameter: Methanmenge

Sowohl die Testsubstanz als auch die Matrix werden ohne Anlaufphase und nebeneinander abgebaut. Allerdings erfolgt der Abbau der Matrix, wie der wesentlich geringere Anstieg der Abbaukurve bei Versuchsbeginn zeigt, mit deutlich geringerer Geschwindigkeit. Der nach etwa 4 Tagen fast parallele Kurvenverlauf des Maltoseabbaus bedeutet, daß der Abbau der Testsubstanz praktisch abgeschlossen ist.

Der Kohlenstoffgehalt der Testsubstanz wurde zu $46,4 \pm 3,3\%$ in Methan umgesetzt.

Der anaerobe Abbau von Stärke (Abbildung 3) erfolgt vergleichsweise mit geringerer Geschwindigkeit; diese ist aber immer noch deutlich größer als bei der Testsubstanz Cellulose (Abbildung 4).

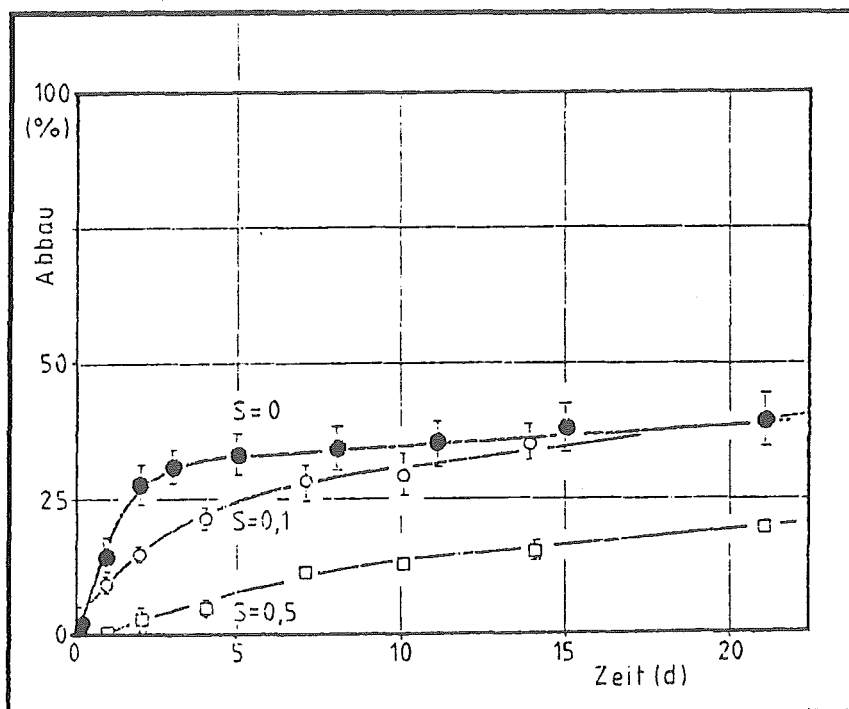


Abb.3: Zeitabhängigkeit des anaeroben Abbaus von Stärke (●) und Carboxymethylstärke*), $S = 0,1$ (○); $S = 0,5$ (□).

*) Die Carboxymethylstärkepräparate wurden freundlicherweise von der Fa. Diamalt Aktiengesellschaft, München, zur Verfügung gestellt.

Außerdem beginnt der Abbau erst nach einer deutlichen Anlaufphase. Für beide Effekte dürfte der gegenüber der Stärke mehr kristalline Charakter nativer Cellulose verantwortlich sein.

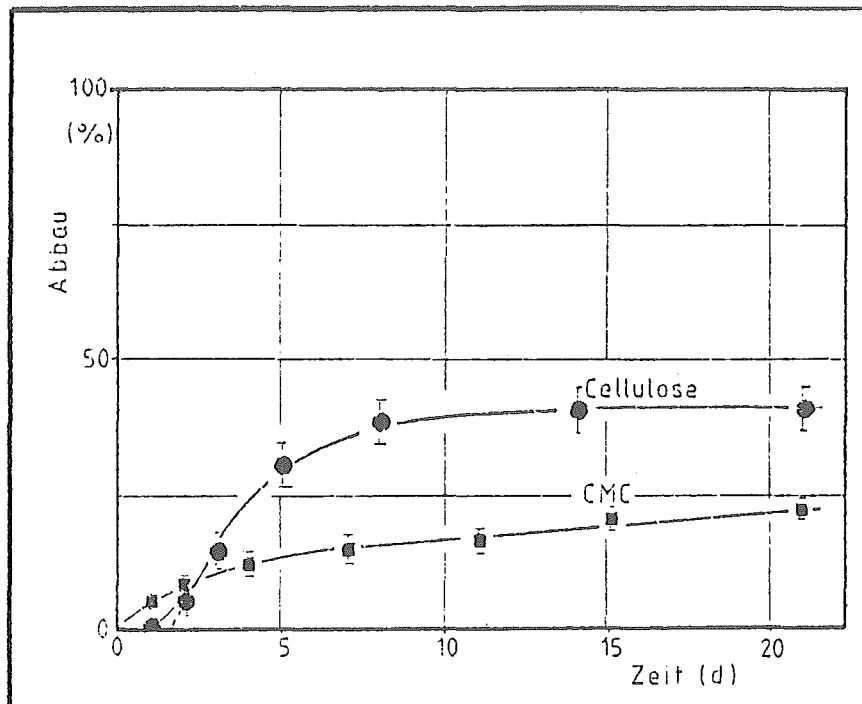


Abb.4: Zeitabhängigkeit des anaeroben Abbaus von Cellulose (mikrokristallin), (●) und Carboxymethylcellulose (S = 0,6 - 0,75), (■).

Dementsprechend erfolgt der Abbau der makromolekular löslichen Carboxymethylcellulose, (CMC)-Tylose C 300, ohne Anlaufphase.

Die getesteten chemisch modifizierten Polysaccharide werden, verglichen mit ihren natürlichen Ausgangssubstanzen, zum einen mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit und zum anderem bei weitem nicht so weitgehend anaerob abgebaut, wie die Abbildungen 3 und 4 deutlich zeigen.

Hydroxyethylcellulose mit dem sehr hohen Substitutionsgrad von 2,5, deren Stammlösung hochviskos war, zeigt zunächst schwach toxisches, im weiteren Versuchsverlauf inertes Verhalten, wie aus dem nach 21 Tagen ziemlich parallelen Kurvenverlauf zur Abszisse geschlossen werden muß. Die mit der Zeit zunehmende Streuung der Meßpunkte könnte auf einen beginnenden Abbau der Testsubstanz hinweisen (Abbildung 5). Die in den Abbildungen 3, 4 und 5 zusammengestellten Untersuchungsergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Substitutionsgrad und anaerobem Abbauverhalten. Mit steigendem Substitutionsgrad wird ein immer geringerer Teil des Kohlenstoffgerüsts der Testsubstanzen zu Methan umgesetzt.

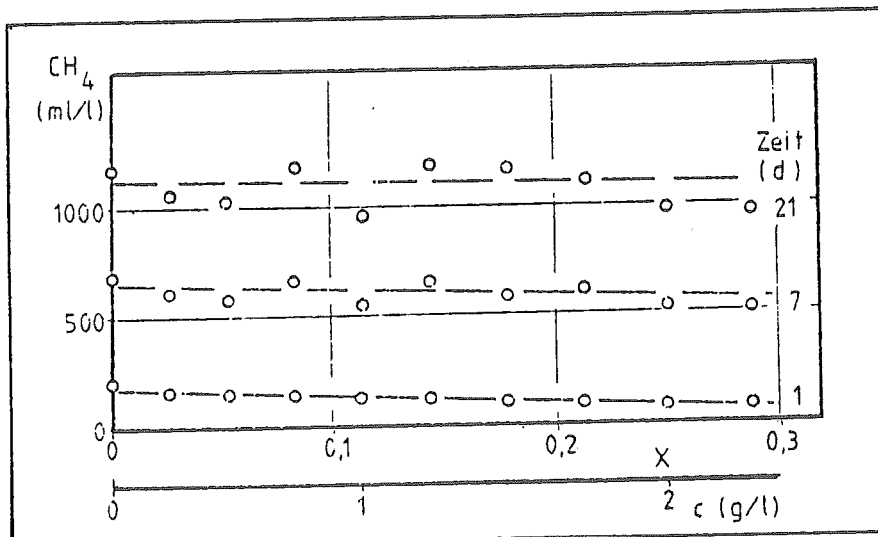


Abb.5: Konzentrationsabhängigkeit des anaeroben Abbauverhaltens von Hydroxyethylcellulose, Substitutionsgrad 2,5.

Faßt man die Untersuchungsergebnisse zusammen, so wurden alle getesteten nichtmodifizierten Saccharide unter den Versuchsbedingungen der ausgearbeiteten Untersuchungsmethode anaerob gut abgebaut.

Die Unterschiede zwischen gefundenem und theoretisch möglichem Abbau zu Methan werden dabei auf die Bildung von Zellsubstanz zurückgeführt. (In einer Versuchsreihe zur Absicherung der Untersuchungsmethode mit ^{14}C -(U)-Glucose wurden von uns in allen 9 mit der markierten Substanz versetzten Mischungen, im Mittel ca. 11% der eingesetzten Aktivitäten im Zellmaterial wiedergefunden.)

Bei den chemisch modifizierten Polysacchariden bestimmt ganz offensichtlich das Ausmaß der Veretherung der OH-Gruppen der Cellulose-bzw. Stärke-Makromoleküle das Abbauverhalten. Sowohl die Abbaugeschwindigkeit als auch das Ausmaß des Abbaus zu Methan werden mit zunehmendem Substitutionsgrad deutlich kleiner. Möglicherweise ist dabei weniger die chemische Natur der Substituenten als deren Anzahl im Molekül entscheidend.

4.2. Untersuchungsergebnisse von Chemikalien der Referenzliste

Die Konzentrationen der Stammlösungen der getesteten Referenzchemikalien betrugen in Abhängigkeit von der Löslichkeit 10 bzw. 2 g/l.

Je nach Versuchsverlauf wurden als Versuchszeit 21 bzw. 28 oder mehr Tage gewählt.

Testsubstanz Phenol

Auf Grund der interessanten Ergebnisse eines Vorversuches (verkürzte Reihe, Konzentration der Stammlösung 10 g/l) wurde im eigentlichen Abbautest zur Herstellung der Mischungen eine Stammlösung verwendet, die die Testsubstanz nur in einer Konzentration von 2 g/l enthielt.

Die Konzentrationsabhängigkeit des Abbauverhaltens von Phenol im Vorversuch (Abbildung 6) zeigt deutlich eine Phase, während der sich die Testsubstanz toxisch verhält. Nach etwa 10 Tagen beginnt dann in den niedrigen Konzentrationsbereichen der Abbau, der sich im weiteren Versuchsverlauf nach höheren Konzentrationsbereichen hin ausdehnt (Anpassung), wie die immer weiter über die Nullprobe rückenden Meßpunkte zeigen.

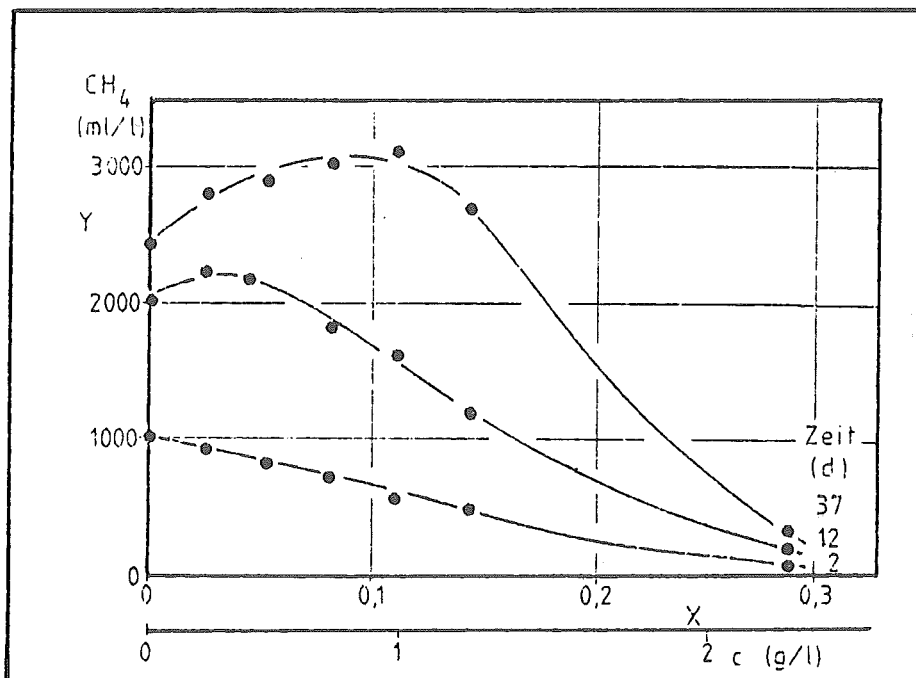


Abb.6: Konzentrationsabhängigkeit des anaeroben Abbauverhaltens von Phenol.

Vorversuch; Phenolstammlösung: 10 g/l.

Wie erwartet, wurde im Abbautest die Testsubstanz (Stamm-lösung 2 g/l) aufgrund der geringeren Konzentrationen in den einzelnen Mischungen im Versuchszeitraum vollständig abgebaut. Der Abbau erfolgt dabei nach einer Anlaufphase, die zwischen 5 und 10 Tagen liegen dürfte, Abbildung 7. Die Ursache für diese wenig präzise Aussage ist der geringe Meßeffect, der durch Meßfehler stark beeinflusst ist, und sich im breiten 95%-Vertrauensbereich der Meßpunkte widerspiegelt. (Entsprechend den absoluten Phenolmengen in den Mischungen liegen die zu erwartenden theoretisch möglichen Methanmengen je einschließlic zwischen 16,7 ml und 150,3 ml.) Bemerkenswert sind die Ergebnisse amerikanischer Autoren, bei denen Phenol (Prüf-konzentration allein 400 mg/l, Testsubstanz alleinige Kohlenstoffquelle, mineralische Nährlösung) nach einer Anlaufphase von 2,5 Wochen abgebaut wurde, und 51,7% statt 58,3 % des Kohlenstoffgehaltes der Testsubstanz zu Methan umgesetzt wurden (14). Ein ähnlicher Wert wird auch in unseren Untersuchungen, wie Abbildung 7 zeigt, erreicht.

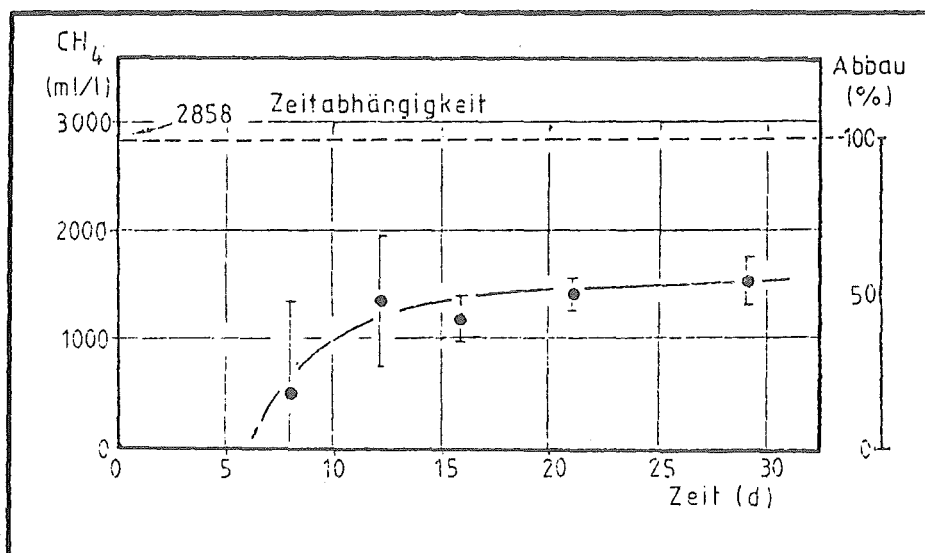


Abb.7: Zeitabhängigkeit des Abbauverhaltens von Phenol.
Phenolstammlösung 2 g/l.

Testsubstanz Methanol

Wie bereits angedeutet, wurde Methanol unter den Versuchsbedingungen ebenfalls abgebaut. Allerdings erfolgt der Abbau, wie Abbildung 8 zeigt, erst nach einer deutlichen Anlaufphase, dann aber mit bemerkenswerter Geschwindigkeit. Auch hier wird der theoretische Wert der Methanbildung aus Methanol von 75% nicht ganz erreicht.

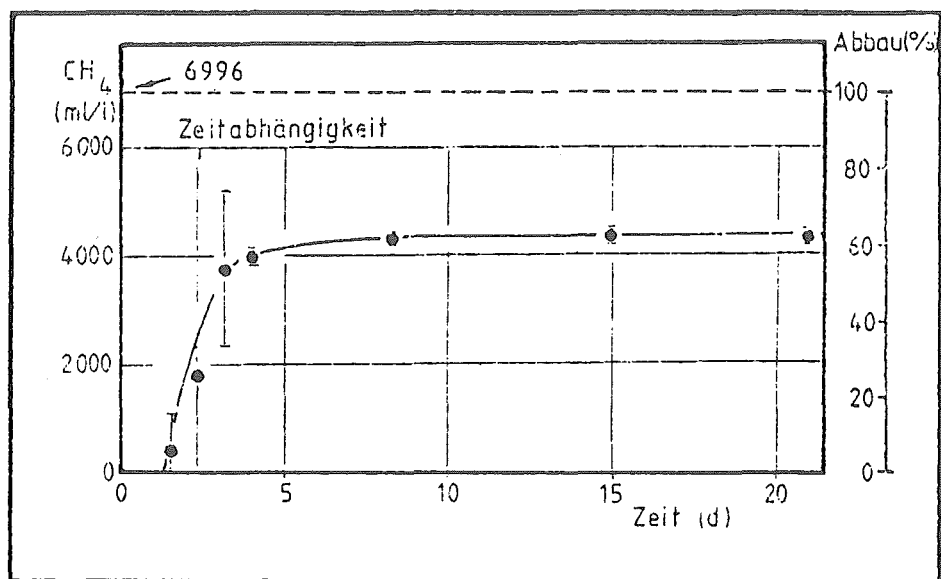


Abb.8: Zeitabhängigkeit des anaeroben Abbaus von Methanol

Testsubstanzen Anilin, 4-Chloranilin, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Stellvertretend für deren anaerobes Abbauverhalten wurden die Ergebnisse von 4-Chloranilin in Abbildung 9 dargestellt. Demnach verhalten sich diese Substanzen, von geringeren Abweichungen abgesehen, (schwach toxisches Verhalten von Anilin zu Beginn bzw. schwach toxisches Verhalten von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bei Ende des 28-tägigen Abbau-tests) im untersuchten Konzentrationsbereich zeitabhängig schwach toxisch bis persistent.

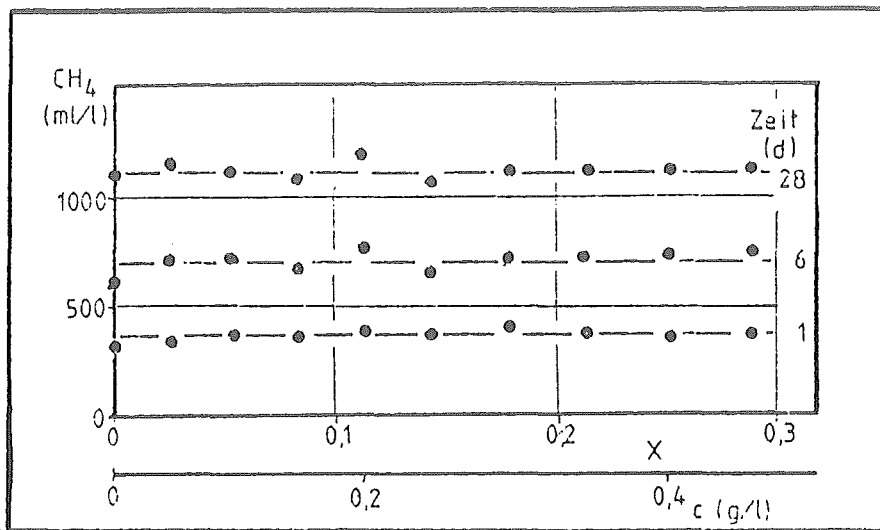


Abb. 9: Konzentrationsabhängigkeit des anaeroben Abbauverhaltens von 4-Chloranilin.

Testsubstanzen 2-Nitrophenol und 4-Nitrophenol

Bei beiden Testsubstanzen werden Übergänge von schwach toxischem zu stark toxischem Verhalten beobachtet, wie Abbildung 10 stellvertretend für 4-Nitrophenol zeigt. Diese Übergänge liegen anfänglich für 2-Nitrophenol bei etwa 400 mg/l und für 4-Nitrophenol bei etwa 200 mg/l und verschieben sich bei beiden Testsubstanzen mit der Zeit nach höheren Werten.

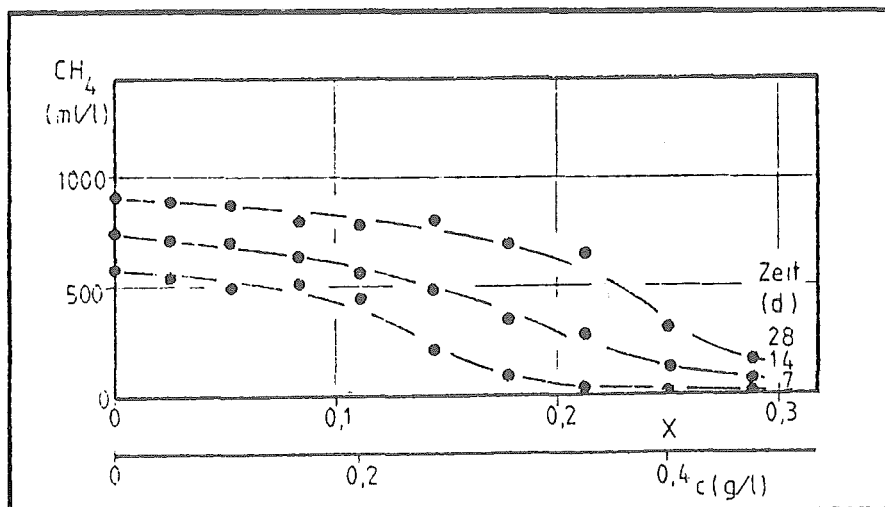


Abb. 10: Konzentrationsabhängigkeit des anaeroben Abbauverhaltens von 4-Nitrophenol.

5. Literatur

1. Ehhalt, D.H.: The atmospheric cycle of methane. Microbial production and utilization of gases, S. 13-32 (überarbeitet von Schlegel, H.G., Gottschalk, G. u. Pfennig, N.). E. Goltze Verlag, Göttingen 1976.
2. Hobson, P.N. u. a.: Anaerobic digestion of organic matter. CRC-Critical Reviews in Environmental Control 4(2), S. 131-191. CRC-Press Inc., Cleveland/Ohio 1974.
3. Wolfe, R.S.: Microbial biochemistry of methane: a study in contrasts. International Review of Biochemistry - Microbial Biochemistry Bd. 21, S. 268-300 (überarbeitet von Quayle, J.R.). University Park Press, Baltimore 1979.
4. Lin Chou, W. u. a.: The effect of petrochemical structure on methane fermentation toxicity. Prog. Water Technol. 10, 545-558 (1978).
5. Owen, W.F. u. a.: Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492 (1979).
6. Wagner, R.: Untersuchungen über das Abbauverhalten organischer Stoffe mit Hilfe der respirometrischen Verdünnungsmethode. II. Die Abbaukinetik der Testsubstanzen. Vom Wasser 47, 241-265 (1976).
7. Wagner, R.: Abbaubarkeit und Persistenz. Vom Wasser 40, 335-367 (1973).
8. Mah, R.A., Smith, M.R. u. Baresi, L.: Studies on an acetate-fermenting strain of Methanosarcina. Appl. Environ. Microbiol. 35, 1174-1184 (1978).

9. Wagner, R.: Grundlagen der statistischen Behandlung einfacher linearer Korrelationen. Vom Wasser 54, 273-292 (1980).
10. Wagner, R.: Untersuchungen über das Abbauverhalten organischer Stoffe mit Hilfe der respirometrischen Verdünnungsmethode. I. Einwertige Alkohole. Vom Wasser 42, 271-305 (1974).
11. Wagner, R.: Neue Gesichtspunkte zur Methodik und zur Beurteilung des Verdünnungs-BSB. Gas-Wasserfach 117, 443-450 (1976).
12. Mahr, I.: Untersuchungen über die Rolle der niederen Fettsäuren beim anaeroben Faulprozess und Einblicke in seine Biozönose. Water Res. 3, 507-517 (1969).
13. Lettinga, G. u. a.: Anaerobic treatment of methanolic wastes. Water Res. 13, 725-737 (1979).
14. Healy Jr., J.B. u. Young, L.J.: Catechol and phenol degradation by a methanogenic population of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 35, 216-218 (1978).

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7244)

Untersuchungen der physiologischen Wirkungen von Schad-
stoffen bei Karpfen

von

Prof. Dr. W. Hanke, Dr. A. Bittner, G. Horn, Dr. R. Müller
und R. Keppler

Zoologisches Institut II der Universität Karlsruhe

Institutsleiter:
Prof. Dr. W. Hanke

Juni 1981

Zusammenfassung

Im Rahmen von Untersuchungen über den Einfluß von Schadstoffen auf Karpfen wurden physiologische Veränderungen nach Einwirkung zweier Gruppen von Stoffen festgestellt. Zur ersten Gruppe gehören die extrem toxischen Schadstoffe Atrazin, HCB, DDT und PCP, zur zweiten Gruppe die allgemeinen Schadstoffe bzw. Lösungsmittel Phenol, Methanol, Chloroform und Harnstoff.

Bestimmungen der Osmolalität und des Elektrolytgehalts im Blutplasma ergaben, daß sich eine schwächere Schädigung in einer Erhöhung der Osmolalität und der Na-Konzentration anzeigen. Bei stärkerer Schädigung (Toxizität) sinkt dann die Osmolalität und der Na-Gehalt ab, die K-Konzentration steigt an.

Beim Harnstoff lagen besondere Veränderungen durch Aufnahme desselben in den Körper vor.

Kurzfristig stieg die Glucose-Konzentration im Blut unter Schadstoff-Einfluß an. Auch der Gehalt der Leber an Glykogen erhöhte sich zunächst. Stärkere Toxizität äußerte sich dann in einer Blutglucose- und Leberglykogen-Senkung. Dieser Komplex wird als Stress-Phänomen gedeutet.

Unter Einfluß von Atrazin verringerte sich im peripheren Blut die Anzahl der Erythrocyten. Es traten dabei lytische Formen auf. Die Zahl der azurophilen Granulocyten wurde erhöht.

Die Anwendung weiterer physiologischer Testverfahren für den Schadstoff-Nachweis wird diskutiert.

Abstract

Investigations about the influence of two groups of pollutants on physiological parameters of carps were performed. The first group consisted of extreme toxic pollutants like atrazin, HCB, DDT and PCP. The general pollutants as phenol, methanol, chloroform and urea belonged to the second group.

Determinations of osmolality and electrolyte content of blood plasma clearly showed that a weak intoxication results in an increase of osmolality and Na concentration. Severe intoxication was indicated by a decreasing osmolality and Na concentration while the K content increased.

In the case of urea, special changes occurred because of the uptake of this compound into the body.

For a short time, plasma glucose increased under the influence of pollutants. The glycogen content of the liver was also firstly augmented. Severe intoxication resulted in a decrease of plasma glucose and liver glycogen. The whole complex is interpreted as stress phenomenon.

Under the influence of atrazin, the amount of red blood cells decreased whereas azurophilic granulocytes increased. Furtheron, lytic stages of erythrocytes were often found.

The use of further physiological tests for the proof on pollutants is discussed.

Einleitung

Die Untersuchung von Fischen nach Einwirkung von Schadstoffen ist in zahlreichen Arbeiten durchgeführt worden, um einerseits den Wirkungsmechanismus von Schadstoffen auf den tierischen Organismus aufklären zu können und andererseits Testobjekte zu erhalten, mit denen auf leichte Weise ein Schadstoffnachweis möglich ist. Die Verwendung von Fischen ist dabei aus zwei Gründen naheliegend. Einerseits sammeln sich Schadstoffe, trotz häufig vorliegender Wasserschwierlöslichkeit im Oberflächenwasser sowohl der Industrie - als auch der landwirtschaftlich genutzten Bezirke. Zum anderen stehen Fische als Wirbeltiere dem Menschen physiologisch, verglichen mit anderen wasserlebenden Tieren, am nächsten, so daß Vergleiche zur Schädlichkeit beim Menschen naheliegend erscheinen. Von den allgemeineren Veröffentlichungen zu dem Problemkreis seien der DFG-Forschungsbericht (1980), die Arbeiten im Bericht von Scherer (ed.), 1979, sowie die in der Reihe Fisch und Umwelt Bd. 1-9 (Reichenbach-Klinke und Ahne, eds.), 1975 - 1981, erschienenen Beiträge erwähnt.

Die in diesem Zusammenhang angewendeten Methoden sind zahlreich und unterschiedlich und umfassen prinzipiell das gesamte physiologisch-toxikologische Methodenspektrum. Grundsätzlich läßt sich zwischen der Lethalitätsprüfung und Untersuchungen im sublethalen Konzentrationsbereich unterscheiden. Die zu den letzteren zählenden Beobachtungen lassen sich elektrophysiologischen, biochemisch-physiologischen oder verhaltensphysiologischen Methoden zuordnen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen haben wir versucht, möglichst viele verschiedene Methoden bei der Untersuchung verschiedenartiger Schadstoffe anzuwenden (s. Lockhart and Metner, 1979), wobei hauptsächlich biochemisch-physiologische Methoden diesem Bericht zugrunde liegen. Die Erfahrungen mit elektrophysiologischen Messungen, z.B. des Operkularpotentials, und verhaltensphysiologischen Beobachtungen (z.B. Messung der Schwimmfähigkeit) sind noch sehr vorläufig. Erste Befunde hierzu sind bei Hanke (ed.), 1980, zu finden.

Bei der Beeinträchtigung der Fische durch Schadstoffe kann man zwischen schadstoffspezifischen und -unspezifischen, stressähnlichen Veränderungen unterscheiden. Spezifische Veränderungen sind in diesem Methodenbereich noch relativ wenig beschrieben worden. Dagegen gibt es jedoch eine Fülle von Untersuchungen, die zu dem Ergebnis gelangten, daß der Schadstoffeinfluß unabhängig von der Art des Schadstoffes als Stressor wirkt und die Reaktion des Fisches ein unspezifisches Phänomen darstellt (zur Übersicht: Pickering (ed.), 1981; Mazeaud et al., 1977; Barton et al., 1980; Chavin, 1973; Fromm, 1980; Fryer, 1975; Hill and Fromm, 1968; Macek, 1968; Peters et al., 1980; Schreck und Lorz, 1978; Strange und Schreck, 1978; Strange et al., 1977).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollten die physiologischen Veränderungen im Blut und einigen Organen nach Einwirkung verschiedenartiger Schadstoffe festgestellt werden. Dabei wurden kurzfristige, von meist hochdosiertem Schadstoff hervorgerufene Wirkungen und längerfristige, von entsprechend niedrig konzentriertem Schadstoff verursachte Effekte beobachtet. In allen Fällen sollten jedoch keine momentane, durch sensorische Effekte ausgelöste Reaktionen festgestellt werden.

Ein Ausblick soll grundsätzlich darlegen, welche Empfindlichkeitsschwellen für die Reaktionen existieren und welche Möglichkeiten zur Verwendung der Reaktionen als Test für Schadstoffverunreinigungen gegeben sind.

Material und Methoden

Hälterungs- und Testanlage

Die Karpfen wurden von Aufzuchtanstalten bezogen und jeweils 1000 bis 1500 Tiere im Institut bei 16° C in einer Durchflußanlage gehalten. Zur Schadstoff-Applikation wurden jeweils 5-8 Karpfen in 10 ltr. Wasser gehalten. Es erfolgte eine Voranpassung für ca. 7 Tage in durchlüftetem täglich gewechseltem Wasser. Dann wurde dem Wasser Schadstoff zugesetzt. Die höheren Dosen von chlorierten Kohlenwasserstoffen wurden in der Regel

mit Lösungsvermittlern (in erster Linie Äthanol) in das Wasser gebracht, um Gleichverteilung zu erreichen. In solchen Fällen wurde auch dem Kontrollwasser 1 ml (0.1 ppm) Äthanol zugesetzt. Grundsätzlich wurde die Schadstoff-Applikation also im stationären (nicht durchströmten), belüfteten System ausgeführt. Daher ist von Anfang an klar, daß die Tiere keiner konstanten Schadstoff-Konzentration ausgesetzt sind, obwohl während der Schadstoff-Anwendung (und auch bei den Kontrollen) täglich zu konstanten Zeiten das Wasser gewechselt wurde. Die Versuchsanordnung macht es außerdem nötig, die Veränderungen der Schadstoffkonzentrationen zu erkennen. Leider ist bisher das gaschromatographische Nachweisverfahren noch nicht soweit ausgebaut, daß wir bei allen Schadstoffen genaue Angaben über die Veränderungen der Schadstoffkonzentrationen machen können. Dies wird jedoch angestrebt und ist für zukünftige Fragestellungen fast verwirklicht.

Bisher wurden genauere Untersuchungen für die angewendeten Phenolkonzentrationen angestellt. Dabei wurde relativ klar nachgewiesen, daß Phenol in den Aquarien bei Besetzung mit Fischen und Durchlüftung innerhalb von 24 Stunden linear um 40% abnimmt, so daß der Konzentrationsverlauf als Zackenkurve dargestellt werden kann mit Spitzen zu Beginn und nach jeweils 24 Std. Dazwischen liegt die allmähliche Abnahme um etwa 40%. Die Abnahme beruht sowohl auf Akkumulation im Fisch als auch Oxidation und Abbau im Wasser. Bei anderen Schadstoffen, wie den chlorierten Kohlenwasserstoffen kommen noch Ablagerungen an den Glaswänden der Aquarien hinzu. Vorversuche haben jedoch gezeigt, daß auch bei den anderen Schadstoffen Konzentrationsänderungen im freien Wasser zwischen 30 und 50% eintreten.

Versuchsdurchführung und Problemstellung

Das Hauptgewicht der Untersuchungen lag auf kurzfristigen Einwirkungen von Schadstoffen, wobei maximal 7 Tage, in den meisten Fällen nur innerhalb der ersten zwei Tage die Schadstoffwirkung verfolgt wurde. Um eindeutige Effekte herausarbeiten zu können, waren die angewendeten Konzentrationen relativ hoch.

Es wurden dazu vier bekannte Extremschadstoffe untersucht: das Herbizid Atrazin, das Fungizid Hexachlorbenzol (HCB), das Pestizid 4,4' DDT und das Holzschutzmittel Pentachlorphenol (PCP). Weiterhin wurden vier Lösungsmittel/verbreitete Verunreinigungen angewendet: die Lösungsmittel Methanol und Chloroform sowie die verbreiteten Verunreinigungen Phenol und Harnstoff.

Die Extremschadstoffe wurden in Konzentrationen von 1 bis 10^4 $\mu\text{g/l}$ (1 ppb bis 10 ppm) angewendet und dabei versucht Dosis-Effektkurven aufzustellen. Bei Phenol, Methanol und Chloroform wurden Konzentrationen von 0.01 bis 1.0 mg bzw. ml/l ausgetestet. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde der Einfluß von 18 g/l (= 300 mM) Harnstoff untersucht. Die Effekte weiterer Harnstoff-Konzentrationen waren Ziel einer anders ausgerichteten Untersuchung (Gupta and Hanke, 1982).

Der Vergleich der Wirkungen dieser verschiedenen Schadstoffe sollte die Frage klären, ob mit den angewendeten Methoden spezifische oder unspezifische Reaktionen ermittelt werden. Weiterhin sollte versucht werden, an Hand von Dosis-Effektkurven die Nachweisgrenzen für Schadstoffe zu ermitteln. Schließlich sollte die unterschiedliche Effektivität (=Toxizität) der Schadstoffe deutlich werden.

Methoden und Probenentnahme

Zur Untersuchungszeit wurden die Karpfen in einer Überdosis von MS 222 betäubt und sofort nach Freilegen des Herzens mit einer heparinisierten Pipette Blut aus dem Herzen entnommen. Das Blut wurde sofort zentrifugiert und das Plasma für die Untersuchungen aufgeteilt.

Weiterhin wurde ein Stück der epaxialen weißen Muskulatur entnommen, gewogen und zum Trocknen für 3 Tage bei etwa 60° gebracht.

Ebenso wurde ein Stück der Leber zur Glykogenbestimmung möglichst schnell in Eis gebracht.

Folgende Methoden wurden dann mit den Proben durchgeführt:

1. Bestimmung der Osmolalität des Plasmas mit einem Knauer Mikroosmometer
2. Bestimmung der Kationenkonzentration (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) im Plasma mit Flammenphotometer oder Atom-Absorption
3. Bestimmung der Glucose-Konzentration mit der Glucose-Oxidase-Reaktion
4. Bestimmung des Trockengewichtsanteils im Muskel
5. Bestimmung des Leberglykogens nach Extraktion des Glykogens, Hydrolyse und Glucose-Oxidase-Reaktion der Glucose

Bei Einwirkung von Harnstoff wurde auch der Harnstoffgehalt des Blutes bestimmt.

Eine Reihe von weiteren Methoden und Nachweisen wurden im Laufe der Arbeit angewendet bzw. durchgeführt. Hierzu zählen Untersuchungen des Gasstoffwechsels, der Konzentration energiereicher Phosphate ("energy charge"), Messungen des Operkularpotentials und der Schwimmfähigkeit. Diese Untersuchungsmethoden haben jedoch im Rahmen der Untersuchung wenig Resultate erbracht (vgl. Hanke (ed.), 1980), so daß auf sie nur im Kapitel "Ausblick" kurz zurückgekommen wird.

Sehr intensiv wurden bei den Karpfen noch die Veränderungen des roten und weißen Blutbilds untersucht. Dazu wurde das Blut ebenfalls mit Glaspipetten aus dem Herz entnommen und mit Hayemscher Lösung zur Zählung der Erythrocyten oder mit einer Mischung aus Neutralrot- und Kristallviolett-Lösungen (Zählung der Leucocyten) verdünnt. Außerdem wurden Blutaussstriche angefertigt und ebenfalls zur Zählung der Erythrocyten, wie auch zur Differenzierung des Blutbildes verwendet (ausführliche Darstellung der Methode und der Resultate bei Horn, 1980). Nähere Hinweise zur gesamten Problematik solcher Blutuntersuchungen bei Knochenfischen liefern die Arbeiten von Haider (1964, 1967 a, 1967 b, 1968 a, 1968 b) und die von Lehmann und Stürenberg (1974).

Ergebnisse und Diskussion

1. Veränderungen des Elektrolythaushaltes im Blut

Die Messungen der Osmolalität und des Elektrolythaushaltes der Karpfen haben gezeigt, daß grundsätzlich bei schwacher Schädigung eine Steigerung der Na-Konzentration und der Plasma-Osmolalität eintritt. Bei stärkerer Toxizität, die schließlich zum Tode führt, kommt es zum Absinken des Na-Gehaltes und der Osmolalität, wobei die K-Konzentration im Plasma leicht ansteigt. Diese zwei Phasen können zeitlich nacheinander nachgewiesen werden, die Steigerung zuerst-die Senkung anschließend, oder werden bei Dosis-Effektkurven deutlich, die Steigerung bei niedrigen, die Senkung bei höheren Dosen zu einer bestimmten Zeit. Für die Extremschadstoffe ATR, HCB, DDT und PCP zeigen dies die Abb. 1 - 7. Diese repräsentieren eine Anzahl von etwa 20 Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen und Zeiten, wobei pro Versuch 5 - 10 Tiergruppen (ca. 50 - 100 Tiere) beobachtet wurden. In den Abb. 1 - 3 werden Versuche mit relativ hohen Schadstoffkonzentrationen dargestellt, wobei deutlich wird, daß sich beim DDT die stark toxische Wirkung innerhalb von 48 Std. gut manifestiert. Bei den beiden anderen Schadstoffen wird dies nicht so deutlich.

In den Abb. 4 und 5 wird ein Konzentrationsvergleich für die 4 Extremschadstoffe gegeben, wobei die Wirkungen nach 6 und 12 Std. festgestellt werden. Sie sind nicht so klar wie nach 24 bzw. 48 Std. zu erkennen. Besonders nach 12 Std. sieht man aber auch hier die stärker toxische Wirkung von DDT. Interessanterweise kann man unter dem Einfluß des PCP das Absinken der Osmolalität und Na-Konzentration und den Anstieg des K-Spiegels im Blutplasma nicht feststellen, obwohl bei den höheren PCP-Konzentrationen nach 24 Std. eine stärkere Mortalität vorlag als bei den anderen drei Schadstoffen.

Daraus könnte man schließen, daß spezifische Unterschiede zwischen PCP und den übrigen Extremschadstoffen bestehen. Dieser Theorie müßte jedoch noch verstärkt nachgegangen werden.

Die Abb. 6 und 7 demonstrieren die Wirkungen recht kleiner Dosen

von diesen Schadstoffen, für längere Zeit (bis 24 Tage) gegeben und machen klar, daß schon 1 - 5 µg/l (1 - 5 ppb) eine Wirkung haben.

Auf Harnstoff-Applikation in der Umwelt gibt es spezifische Veränderungen der Osmolalität, weil Harnstoff vom Tier aufgenommen wird und auch bis zu höheren Konzentrationen toleriert wird. Die Abb. 8 und 9 zeigen die Veränderungen. Auch hier kommt es zu kurzfristigem Anstieg der Na⁺-Konzentration mit anschließendem leichten Absinken, sowie einer charakteristischen Zunahme von K⁺ und Ca⁺⁺ im Blutplasma.

Die Schadstoffe Phenol, Chloroform und Methanol beeinflussen den Elektrolythaushalt kaum. Nur für Phenol, das in Konzentrationen von 0.05, 0.1 und 1.0 mg/l angewendet wurde, ergab sich nach 3 - 7 Tagen eine relativ klare Erniedrigung der Osmolalität und des Na-Gehaltes. Die Befunde bei Methanol (0.1, 0.5 und 1.0 ml/l) und bei Chloroform (0.01, 0.05 und 0.1 ml/l) waren sehr variabel. Dies ist besonders deshalb verwunderlich, weil höhere Dosen dieser Schadstoffe zum Tod der Tiere führen. Allgemein läßt sich jedoch sagen, daß diese Schadstoffe deutlich länger (3 - 7 Tage) einwirken müssen als die oben erwähnten Extremschadstoffe, um sichtbare oder meßbare Reaktionen hervorzurufen.

Zur Deutung der bei den Extremschadstoffen auftretenden Elektrolytveränderungen muß daraufhin gewiesen werden, daß diese Stoffe wahrscheinlich die Aktivität der Na-K-ATPase in den Kiemen, die für die Aufnahme der Na-Ionen aus dem Süßwasser verantwortlich ist, stören. Nach den Ergebnissen müßte zunächst bei niederen Konzentrationen eine Aktivierung des Transportenzymes auftreten, der erst bei stärkerer Einwirkung eine Hemmung folgt. Es ist keine eindeutige Aussage darüber möglich, ob die Gruppe der allgemeineren Schadstoffe und Lösungsmittel dabei ebenso wirkt wie die Extremschadstoffe.

Eigene Untersuchungen der Aktivität der Na-K-ATPase in den Kiemen haben bisher noch keine klaren Befunde ergeben. Es gibt jedoch Hinweise in der Literatur, daß ATPasen in verschiedenen Geweben von Schadstoffen beeinflusst werden, so daß diese Erklärung zutreffen könnte (Desai and Koch, 1977; Verma et al.,

1978; Übersicht bei Bouquegneau and Gilles, 1979).

2. Veränderungen des Kohlenhydrathaushaltes, besonders der Glucose-Konzentration im Blut

Die Messung des Plasma-Glucosegehaltes führt zu eindeutigen Veränderungen bei der Schadstoff-Einwirkung. Diese Veränderungen sind als unspezifische, stressähnliche Reaktionen zu deuten. Es treten in der Regel in recht kurzer Zeit nach einer Schadstoff-Einwirkung Erhöhungen des Blutglucose-Spiegels ein. Bei den Kontrollwerten der Plasma-Glucose, also den Werten von unbehandelten Tieren treten besonders hohe Schwankungen auf. Als Normalwerte liegen bei Karpfen im Plasma (nicht im Gesamtblut, der Plasma-Glucose-Wert ist doppelt so hoch wie der Blutglucose-Wert) zwischen 60 und 100 mg/100 ml vor. Oft können jedoch höhere Werte festgestellt werden. Diese zeigen an, daß die Kontrolltiere ebenfalls gestresst sind, entweder durch zuviel Hantieren (Umsetzen etc.) oder durch zu langsames Abtöten mit Jagen oder, was häufig vorkommt, durch Infektionen der Karpfen.

Es bedarf deshalb großer Erfahrung in Haltung und Auswahl und auch im Durchführen adäquater physiologischer Teste, um bei Karpfen klare Werte zu bekommen.

Ähnlich wie bei den Veränderungen des Osmomineralhaushaltes demonstrieren Zeitabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Glucosezunahme die Wirkungen der Schadstoffe (Abb. 10-14). Man erkennt, daß nur kurzfristig eine Erhöhung eintritt, die bei den Extremschadstoffen nach 6 Std. Einwirkungszeit am deutlichsten ist. Die Dosis-Effektkurve gibt an, daß beim DDT schon 1 µg/l (1 ppb) nachzuweisen ist. Bei Atrazin und HCB ist der Nachweis erst ab 100 µg/l eindeutig.

Ähnliches gilt für das PCP, wo nach 6 Std. bei 500 und 1000 µg/l eine deutliche Erhöhung vorlag (Versuch 38: Kontrollwert: 82.9; 100 µg/l: 98.7; 500 µg/l: 195.9; 1000 µg/l: 322.5 mg/100 µl). Nach 12 Std. war auch der Wert bei 100 µg/l PCP auf 125.8 mg/100 ml angestiegen.

Die Bestimmung des Leberglykogengehaltes macht klar, daß die Erhöhung der Blutglucose nicht auf Kosten des Leberglykogens geht. Vielmehr wird dieses zunächst ebenfalls erhöht und erst bei länger andauernde Schadstoffeinfluß vermindert. Die endokrinologischen Stoffwechselregulationen, die zu diesen Veränderungen führen, sind also nicht im Regulationsprozeß durch Adrenalin, sondern in der gluconeogenetischen Reaktion auf Corticosteroide zu suchen, was den Vorstellungen des Stress-Ablaufs entspricht.

Auch bei der Anwendung von Harnstoff als Schadstoff kommt es zu deutlichen Erhöhungen der Plasmaglucose, was allerdings den Einfluß hoher Konzentrationen voraussetzt.

Von den übrigen Schadstoffen Methanol, Chloroform und Phenol bewirkt Chloroform die deutlichste Erhöhung (0.05 ml/l: ca. 150 mg/100 ml). Aber auch bei 1.0 mg/l Phenol findet sich die Glucose-Erhöhung. Sie läßt sich bei diesen Schadstoffen erst etwas später (n. 12 - 24 Std.) erkennen. Genauere Untersuchungen über den Zeitverlauf liegen hierbei noch nicht vor (nähere Angaben bei Hanke, ed. , 1980).

3. Veränderungen des Blutbildes

Die hämatologischen Untersuchungen wurden nur mit Atrazin durchgeführt, da die relativ aufwendige Methode keine Vergleichsuntersuchungen mit anderen Schadstoffen erlaubte. Die Untersuchung des Blutbildes bei Fischen ist sehr viel schwieriger als beim Menschen und erfordert stärkere Einarbeitung. Besonders die Zählung der weißen Blutkörperchen in Zählkammern kann zu Fehldeutungen führen, da sehr unterschiedliche Zelltypen auftreten und vor allem die Thrombocyten oder Spindelzellen, die im peripheren Blut noch als Zellen und nicht nur als Plättchen auftreten, schwieriger zu erkennen sind.

Die Charakterisierung des Blutbildes erfolgte nach den Arbeiten von Haider (1964; 1966; 1967 a; 1967 b; 1968 a) und Lehmann und Stürenberg (1974).

Bei der Untersuchung des Karpfenblutes wurde besonders deut-

lich, daß auf Grund von Infektionen starke Veränderungen bereits in den Kontrollgruppen auftreten. Dies wird besonders im differenzierten Blutbild klar. Bei den Erythrocyten gibt es neben den normalen kernhaltigen Zellen prolytische und lytische Erythrocyten, die beide als Abbaustadien angesprochen werden müssen und deren Auftreten als Schädigung der roten Blutzellen gedeutet werden kann. Als Schädigung der Erythrocyten kann außerdem das Auftreten sogen. "punktierter" Formen angesehen werden. Dabei tritt im Plasmasaum der Zellen nach Färbung eine deutliche Granulation auf, die ebenfalls den Abbau der Erythrocyten einleiten dürfte. Zum Abschluß der Auflösung von Erythrocyten treten sogen. "rote Flecken" und "Speichenradformen" auf. Dies sind cytoplasmatische Überreste nach Auflösung des Zellkerns (vgl. Abb. 15).

Die Erythrocytenzahl verändert sich etwas mit der Jahreszeit. Während dieser Monate durchgeführte Untersuchungen ergaben, daß Dosen von 100 und 1000 $\mu\text{g/l}$ Atrazin deutliche Verringerungen der Erythrocytenzahl zur Folge hatten. 10 $\mu\text{g/l}$ Atrazin führte zu Variationen der Erythrocytenzahl, woraus jedoch schließlich ebenfalls eine Verringerung resultierte (Abb. 16-18). Parallel zur Verringerung der Erythrocytenzahl wurden in vermehrtem Umfang Abbaustadien deutlich.

Ähnlich deutlich waren Veränderungen in der Anzahl der azurophilen Granulocyten nach Einwirkung von Atrazin zu erkennen. Hierbei wurde die Anzahl der Granulocyten im Vergleich zur Anzahl von Erythrocyten im differenzierten Blutbild berechnet. Dies ist die sogen. "indirekte" Methode, während die Granulocytenzählung in der Thoma-Kammer als "direkte" Methode bezeichnet wird. Diese "indirekte" Methode ergab konstantere Werte als die "direkte", was wahrscheinlich auf viele Fehlzählungen zurückzuführen ist.

Die Einwirkung von 10, 100 und 1000 $\mu\text{g/l}$ (10 - 1000 ppb) führte zu starken Veränderungen der Anzahl azurophiler Granulocyten (Abb. 19-21). Dabei wird deutlich, daß unter Umständen nicht sofort eine Vermehrung einsetzt, sondern eine 1 - 2 Tage dauernde Reduktion vorkommen kann. Die Neubildung von Granulocyten, die beim Einfluß des Schadstoffs verbraucht werden, er-

fordert also möglicherweise etwas Zeit. Die Geschwindigkeit der Antwort muß von der Reaktionsfähigkeit des Karpfens abhängen, wobei allerdings den Untersuchungen immer Gruppen von 5 - 8 Tieren zugrunde lagen.

Das Grundprinzip der Reaktion auf diese Schadstoffe ist also eine Verminderung der Erythrocyten durch Schädigung der peripheren Zellen und eine Vermehrung der azurophilen Granulocyten. Veränderungen der Anzahl der verschiedenen Lymphocyten bleiben unklar. Die beobachtete Vermehrung der Granulocyten ist sicher eine Neubildung, da teilweise zunächst eine Verminderung und erst später die Vermehrung beobachtet wurde. Die umfangreichen Details der Untersuchung sind Horn (1980) zu entnehmen.

Übersicht und Bedeutung der Ergebnisse

Überblickt man die dargestellten Ergebnisse im Hinblick auf die zwei wesentlichsten Intentionen der Arbeit (Finden von physiologischen Testparametern für Schadstoffe, Charakterisieren der Spezifität der Reaktionen) so läßt sich feststellen, daß trotz oft recht klarer Ergebnisse die verschiedenen Untersuchungsmethoden, die sich in den 3 Kapiteln widerspiegeln, nur nach Einarbeitung und mit recht viel Erfahrung anwenden lassen, um einen Schadstoffeinfluß zu ermitteln.

Die Veränderungen des Osmomineralhaushaltes sind auf Grund der zwei beobachteten Phasen, die nur beim Vergleich vieler Versuche sich deutlich abzeichnen, nicht immer sofort erkennbar. Die Grenzdosen für die Extremschadstoffe liegen in kurzfristiger Einwirkung dabei bei 10 - 100 µg/l, eine schon recht hohe Dosis.

Die vermutete Ursache für diese Elektrolytveränderungen, Veränderungen der Aktivität der Na-K-ATPase der Kiemen, konnte trotz einiger Bemühungen, die noch fortgesetzt werden, bisher nicht eindeutig erfaßt werden.

Der Vergleich der Schadstoffe gibt einige Hinweise, daß drei Gruppen von unterschiedlicher Einflußnahme unterschieden werden können: die Extremschadstoffe Atrazin, HCB, DDT, das PCP und die allgemeinen Lösungsmittel Phenol, Methanol, Chloroform etc.

Damit wäre eine spezifische Wirkung denkbar.

Die Veränderung der Glucosekonzentration im Blut (möglicherweise zusammengefaßt mit der Veränderung des Leberglykogens) ist die deutlichste, empfindlichste (Nachweisgrenze 5 ppb), am leichtesten zu erfassende, aber auch unspezifischste Reaktion auf die Schadstoffe. Sie entspricht der Stress-Reaktion der Säuger. Es ist nachzuweisen, daß parallel der Cortisol-Spiegel im Blut ansteigt. Untersuchungen hierzu sind im Gang. Schwierigkeiten für die Durchführung ergeben sich aus der Variabilität der Kontrollwerte für Blutglucose, die bei gestörten Fischen sehr schnell zunimmt.

Die hämatologischen Reaktionen des Karpfens auf Atrazin sind nicht sehr empfindlich (Nachweisgrenze 10 ppb), zeigen sich jedoch dem eingearbeiteten Untersucher sehr klar, wenn die Tiere nicht unter starken infektiösen Veränderungen leiden.

Für alle Untersuchungen gilt, daß gleichmäßiges, gesundes Tiermaterial, das leider nicht auf Dauer zu erhalten ist, eine wesentliche Erleichterung solcher Untersuchungen wäre.

Vorläufige Resultate weiterer Untersuchungen

Untersuchungen der Energiebilanz (Menge an ATP und anderen chemischen Energieträgern in Leber und Muskel) ergaben eine Abnahme unter Schadstoffeinfluß. Allerdings ist der Aufwand solcher Messungen so groß, daß bisher keine endgültigen Resultate erhalten wurden (vgl. Hanke, 1980).

Bestimmungen der Acetylcholinesterase-Aktivität im Gehirn und im Blut geben Hinweise auf eine vorübergehende Aktivierung und anschließende Hemmung dieses Enzyms. Dies bedeutet, daß wahrscheinlich zunächst eine gesteigerte Erregbarkeit induziert wird, später dagegen die Tiere weniger erregbar werden. Hierzu sind allerdings weitere Untersuchungen mit exakter Methode notwendig.

Untersuchungen des Gasstoffwechsels haben gezeigt, daß die Atmungsrate sich ebenfalls unter Schadstoffeinfluß ändert. Mit stärkerem Schadstoff-Einfluß nimmt die O₂-Aufnahme in der Regel mit der Zeit ab.

Die Operkularfrequenz nimmt in der Regel zu, wenn Schadstoffe einwirken. Sehr viel Augenmerk wurde auf die Untersuchung der Schwimmfähigkeit der Tiere gelegt. Dazu wurde eine Apparatur entwickelt, in der die Tiere gegen eine Strömung schwammen. Es wurde automatisch registriert, wann die Tiere abgetrieben wurden. Vorversuche mit dieser Apparatur haben gezeigt, daß bereits Beeinträchtigungen der Tiere mit sehr geringen Schadstoffkonzentrationen nachgewiesen werden können. Auch dieses Testverfahren wird noch ausgebaut.

Literatur

- Barton, B.A., Peter, R.E. and Paulencu, C.R. (1980), Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (Salmo gairdneri) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 805 - 811.
- Bouqueneau, J.M. and Gilles, R. (1979), Osmoregulation and pollution of the aquatic medium. In Gilles, R. (ed.) Mechanisms of osmoregulation in animals. John Wiley, Chichester.
- Chavin, W. (1973), Responses of fish to environmental changes. C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Desaiah, D. and Koch, R.B. (1977), Influence of solvents on the pesticide inhibition of ATPase activities in fish and insect tissue homogenates. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24, 847 - 852.
- DFG, Forschungsbericht (1980), Methoden der Toxizitätsprüfung an Fischen. Situation und Beurteilung, Harald Bold Verlag, Boppard.
- Fromm, P.O. (1980), A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. Env. Biol. Fish. 5, 79 - 93.
- Fryer, J.N. (1975), Stress and adrenocorticosteroid dynamics in the goldfish, Carassius auratus. Can. J. Zool. 53, 1012 - 1020.
- Gupta, O.P. and Hanke, W. (1982), The effects of osmotic stressors on the stenohaline carp (Cyprinus carpio). Comp. Biochem. Physiol. 71 A, 165 - 173.
- Haider, G. (1964), Zur Kenntnis von Schwermetallvergiftungen bei Fischen. I. Bleivergiftung bei Regenbogenforellen (Salmo gairdneri Rich.) und ihr Nachweis. Z. f. angew. Zool. 51, 347 - 368.
- Haider, G. (1967 a), Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. I. Beobachtungen an Zellen der roten Reihe. Zool. Anz. 179, 355 - 384.
- Haider, G. (1967 b), Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. II. Beobachtungen an Spindelzellen. Zool. Anz. 179, 384 - 409.

- Haider, G. (1968 a), Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. III. Beobachtungen an Leukozyten und Plasmazellen. Zool. Anz. 180, 110 - 310.
- Haider, G. (1968 b), Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. IV. Blutbildungsstätten und Blutbildung. Zool. Anz. 181, 203 - 226.
- Hanke, W. (ed.) (1980), Untersuchungen über den Einfluß von Schadstoffen auf Fische. Karlsruher Beiträge zur Zoophysiology, Bd. 5.
- Hill, C.W. and Fromm, P.O. (1968), Response of the interrenal gland of rainbow trout (Salmo gairdneri) to stress. Gen. comp. Endocr. 11, 68 - 77.
- Horn, G. (1980), Der Einfluß von Atrazin auf das Blutbild des Karpfens (Cyprinus carpio L.). Thesis, Universität Karlsruhe.
- Lehmann, J. and Stürenberg, F.J. (1974), Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri Rich.). I. Methodik zur Blutentnahme und Blutuntersuchung bei Fischen. Gewässer und Abwässer 53/54, 114 - 132.
- Lockhart, W.L. and Metner, D.W. (1979), Biochemical tests for fish. In Scherer, E. (ed.), Toxicity tests for freshwater organisms. Can. Spec. Publ. of Fisheries and Aquatic Sciences 44.
- Macek, K.J. (1968), Growth and resistance to stress in brook trout fed sublethal levels of DDT. J. Fish. Res. Bd. Can. 25, 2443 - 2451.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F. and Donaldson, E.M. (1977), Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. Trans. Am. Fish. Soc. 106, 201 - 212.
- Peters, G., Delventhal, H. and Klinger, H. (1980), Physiological and morphological effects of social stress in the eel (Anguilla anguilla L.). Arch. Fisch Wiss. 30, 157 - 180.
- Pickering, A.D. (ed.) (1984), Stress and fish. Academic Press, London.
- Reichenbach-Klinke, H.H. and Ahne, E. (eds.) (1975 - 1981), Fisch und Umwelt, Schriftenreihe für Fischpathologie und Fischökologie, Bd. 1 - 9, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Scherer ; E. (ed.) (1979), Toxicity tests for freshwater organisms. Can. Spec. Publ. of Fisheries and Aquatic Sciences 44.
- Schreck, C.B. and Lorz, H.W. (1978), Stress response of coho salmon (Oncorhynchus kisutch) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress. J. Fish. Res. Bd. Can. 35, 1124 - 1129.
- Strange, R.J. and Schreck, C.B. (1978), Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). J. Fish. Res. Bd. Can. 35, 345 - 349.
- Strange, R.J., Schreck, C.B. and Golden, J.T. (1977), Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. Trans. Am. Fish. Soc. 106, 213 - 218.
- Verma, S.R., Bansal, S.K., Gupta, A.K. and Dalela, R.C. (1978), In vivo effect of ATPase in certain tissues of Labeo rohita and Saccobranchus fossilis, following chronic chlordane intoxication. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 20, 769 - 777.

- Abb. 1 : Einfluß hoher Dosen von Atrazin auf Osmolalität und Na-Konzentration im Plasma abhängig von der Zeit (leichte Schädigung).
- Abb. 2 : Einfluß hoher Dosen von HCB auf Osmolalität und Na-Konzentration im Plasma abhängig von der Zeit (noch keine deutliche Schädigung).
- Abb. 3 : Einfluß hoher Dosen von DDT auf Osmolalität und Na-Konzentration im Plasma abhängig von der Zeit (starke Schädigung).
- Abb. 4 : Vergleich der Wirkung von 4 Konzentrationen der 4 Schadstoffe Atrazin, HCB, DDT und PCP nach 6 Std. Einwirkung. Grad der Schädigung ist an der Erniedrigung der Osmolalität und des Na-Gehaltes und der Erhöhung des K^+ -Gehaltes zu erkennen.
- Abb. 5 : Vergleich der Wirkung von 4 Konzentrationen der 4 Schadstoffe Atrazin, HCB, DDT und PCP nach 12 Std. Einwirkung. Grad der Schädigung ist an der Erniedrigung der Osmolalität und des Na-Gehaltes und der Erhöhung des K^+ -Gehaltes zu erkennen.
- Abb. 6 : Wirkung geringer Dosen von Atrazin, HCB und DDT auf Osmolalität und Elektrolytgehalt. Grad der Schädigung ist an der Erniedrigung der Osmolalität und des Na-Gehaltes und der Erhöhung des K-Gehaltes zu erkennen.
- Abb. 7 : Langzeitwirkung von Atrazin, HCB und DDT in niedrigen Dosen auf Osmolalität und Elektrolytgehalt. Grad der Schädigung ist an der Erniedrigung der Osmolalität und des Na-Gehaltes zu erkennen.
- Abb. 8 : Veränderungen der Blutplasmawerte bei Einwirkung von 300 mMol Harnstoff.
- Abb. 9 : Veränderungen der Plasma-Elektrolytgehalte und des Wassergehaltes im Muskel bei Einwirkung von 300 mMol Harnstoff.
- Abb. 10 : Zeitliche Veränderungen von Blutglucose und Leberglykogen bei Einwirkung hoher Dosen von Atrazin.
- Abb. 11 : Zeitliche Veränderungen von Blutglucose und Leberglykogen bei Einwirkung hoher Dosen von HCB.
- Abb. 12 : Zeitliche Veränderungen von Blutglucose und Leberglykogen bei Einwirkung hoher Dosen von DDT.
- Abb. 13 : Dosis-Effektkurve der drei Schadstoffe 6 Std. nach Beginn des Einflusses auf Plasmaglucose und Leberglykogen.
- Abb. 14 : Langzeitveränderungen geringer Dosen von den drei Schadstoffen auf Plasmaglucose und Leberglykogen. Absinken der Blutglucose demonstriert die starke Schädigung.
- Abb. 15 : Auftreten von Abbaustadien der Erythrocyten im differenzierten Blutbild nach Einfluß von Atrazin (oben 1 mg/l 48 Std.; mitte 100 μ g/l 96 Std.; unten 100 μ g/l 72 Std.). Man erkennt normale (N), prolytische (PL), lytische (L), rote Flecken-(RF) Erythrocyten.
- Abb. 16 : Abnahme der Erythrocytenzahl mit der Zeit bei 1 mg/l Atrazin.
- Abb. 17 : Abnahme der Erythrocytenzahl mit der Zeit bei 100 μ g/l Atrazin.
- Abb. 18 : Abnahme der Erythrocytenzahl mit der Zeit bei 10 μ g/l Atrazin.
- Abb. 19 : Veränderung der Anzahl azurophiler Granulocyten mit der Zeit bei 1 mg/l Atrazin.
- Abb. 20 : Veränderung der Anzahl azurophiler Granulocyten mit der Zeit bei 100 μ g/l Atrazin.
- Abb. 21 : Veränderung der Anzahl azurophiler Granulocyten mit der Zeit bei 10 μ g/l Atrazin.

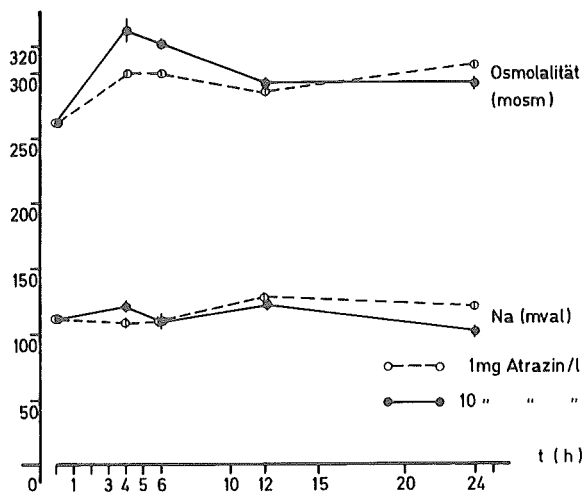


Abb. 1

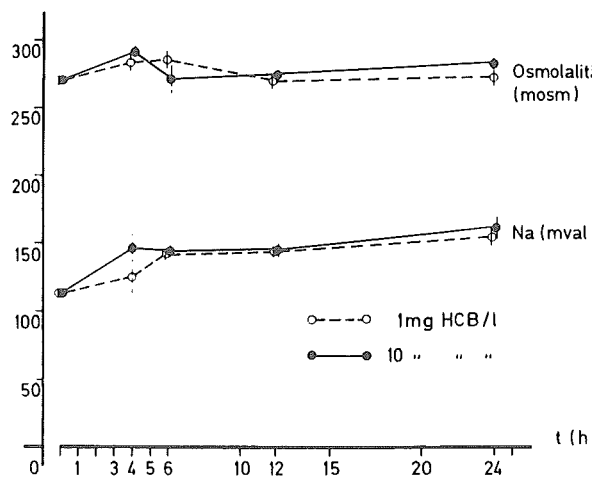


Abb. 2

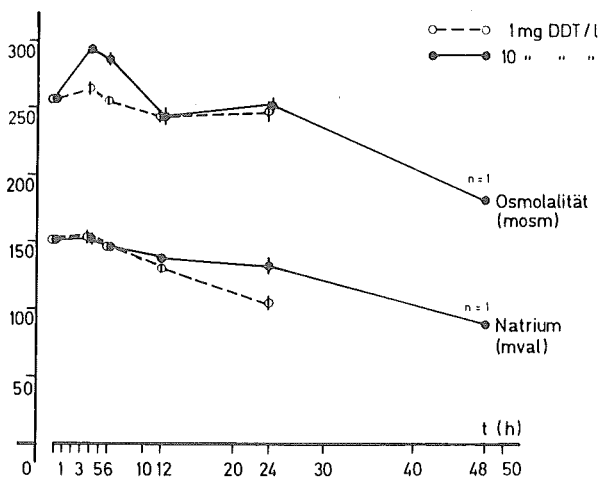


Abb. 3

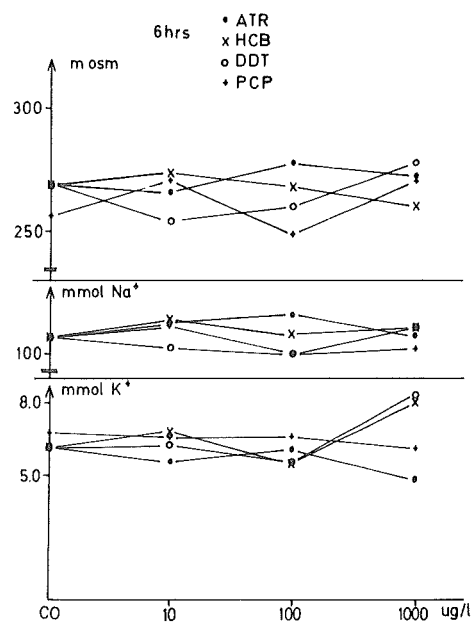


Abb. 4

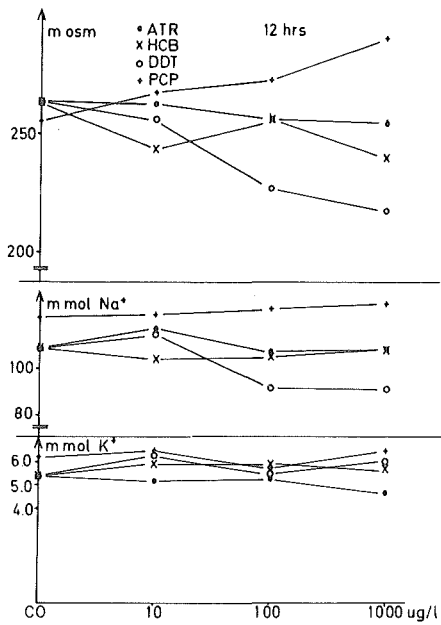


Abb. 5

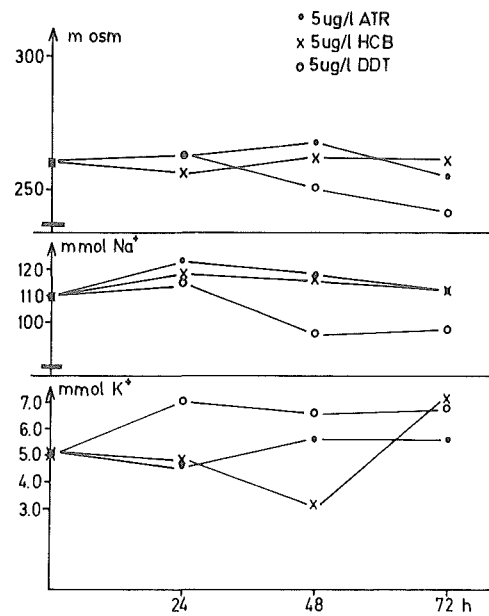


Abb. 6

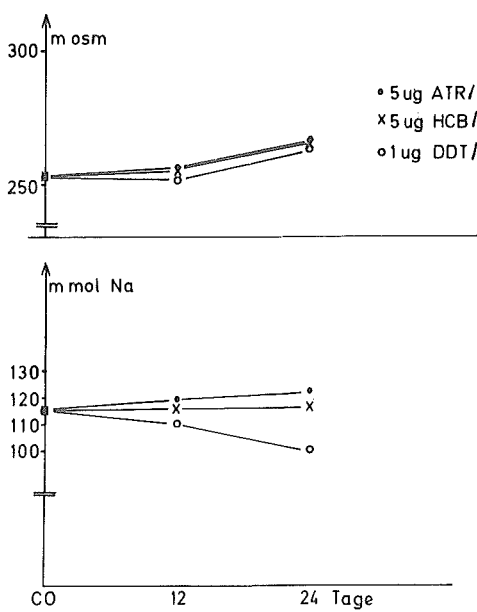


Abb. 7

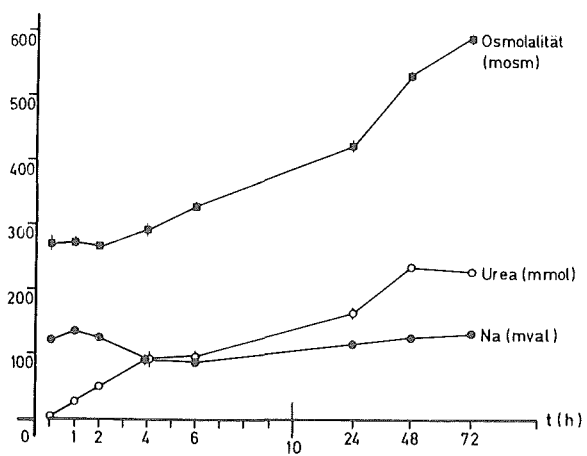


Abb. 8

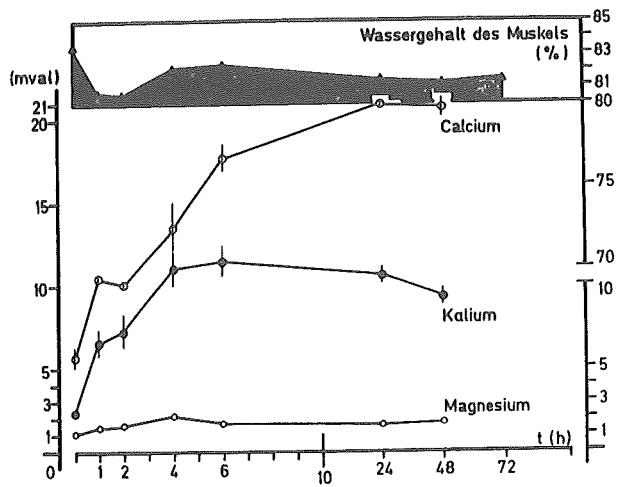


Abb. 9

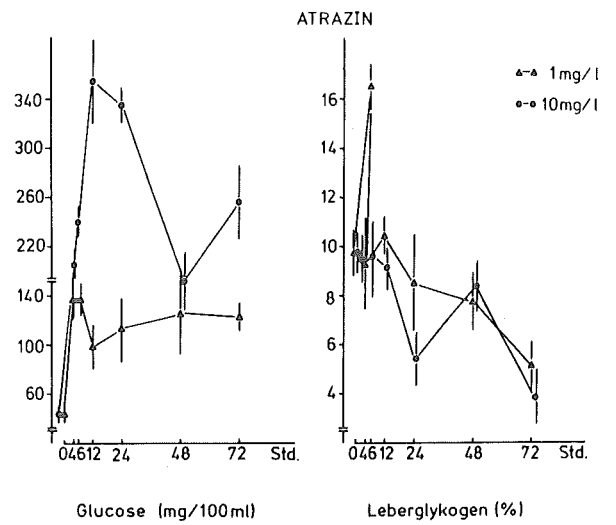


Abb. 10

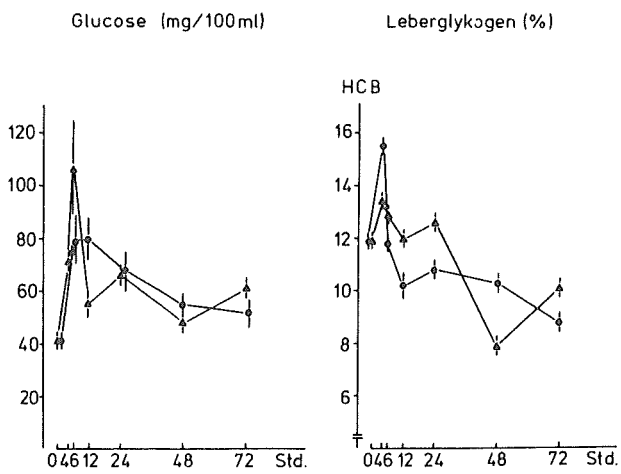


Abb. 11

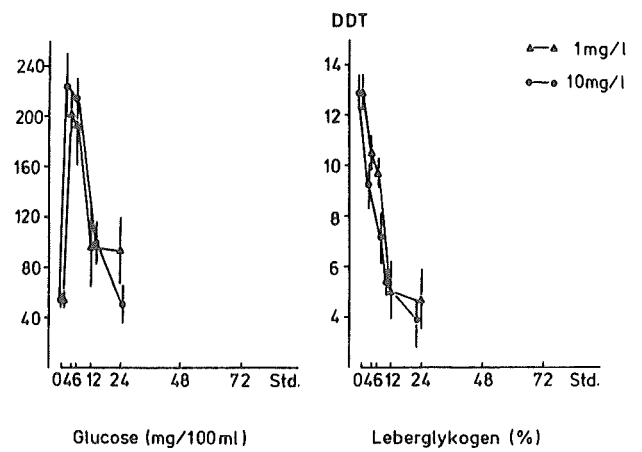


Abb. 12

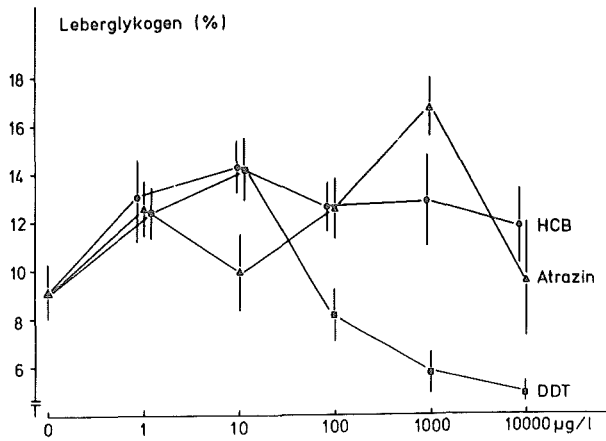
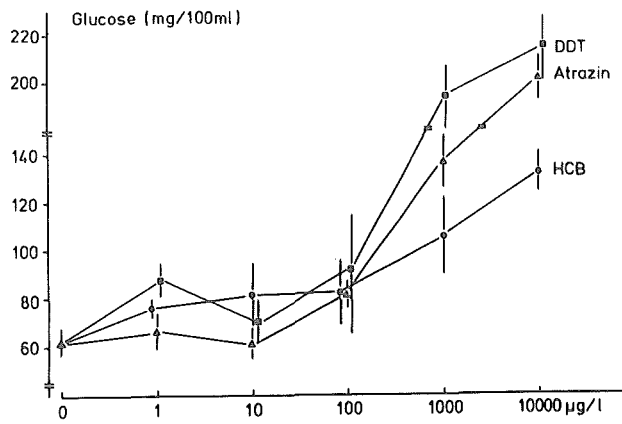
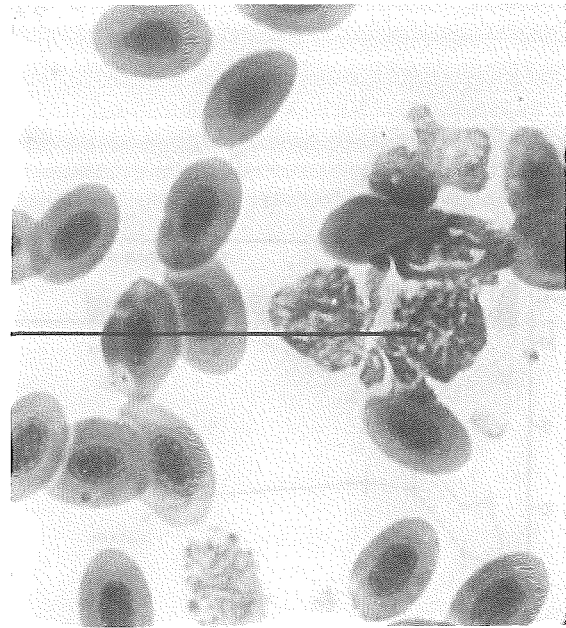
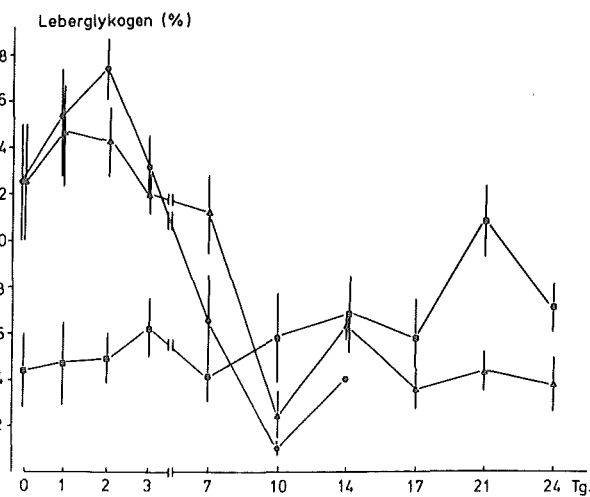
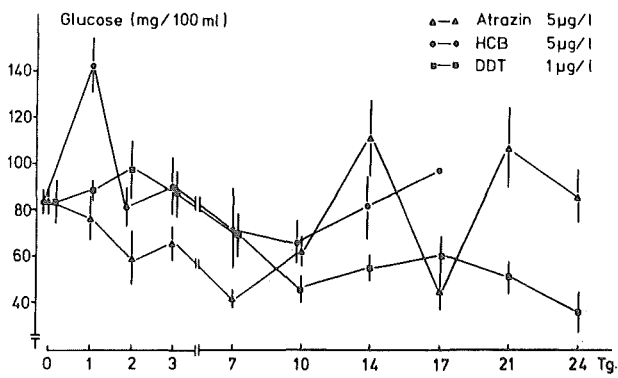
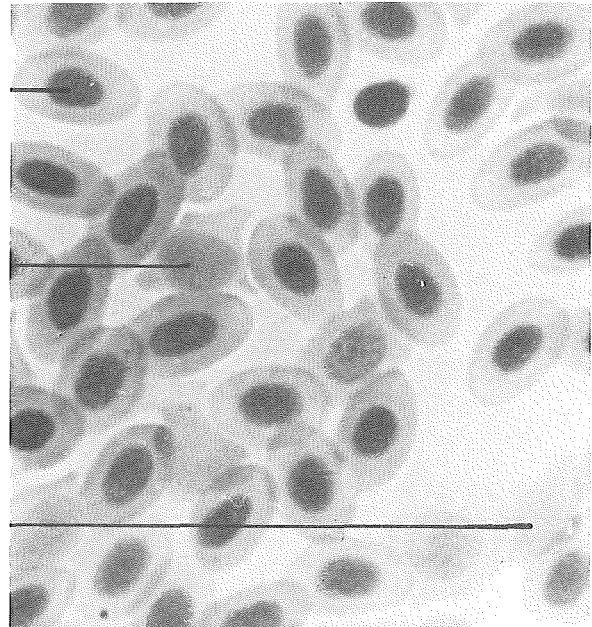


Abb. 13



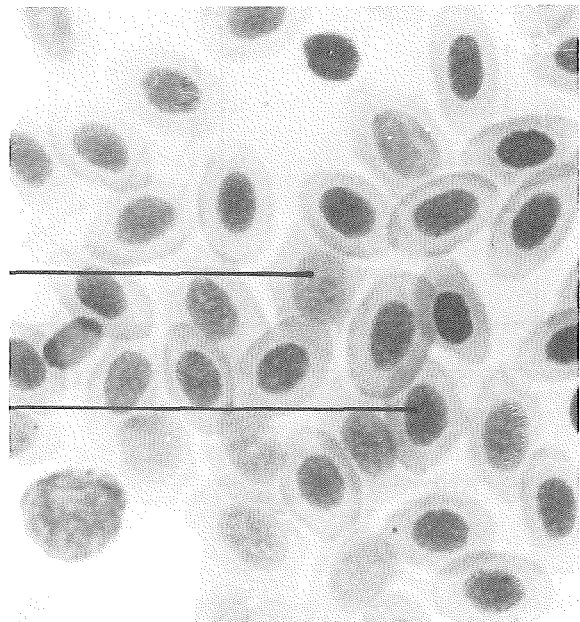
RF



N

PL

L



PL

N

Abb. 15

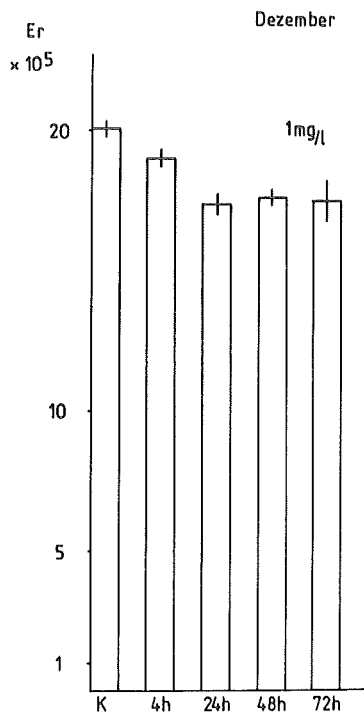


Abb. 16

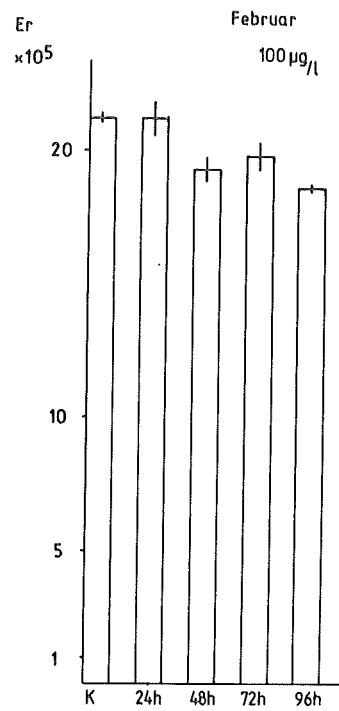


Abb. 17

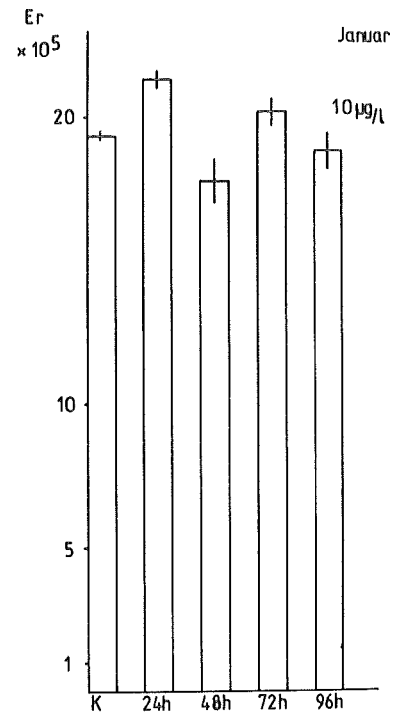


Abb. 18

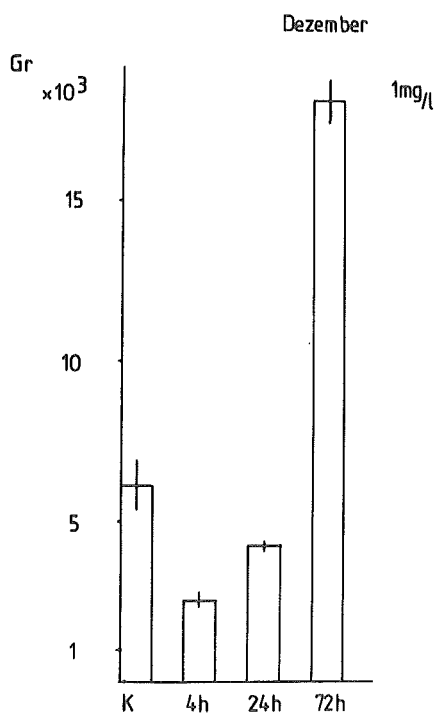


Abb. 19

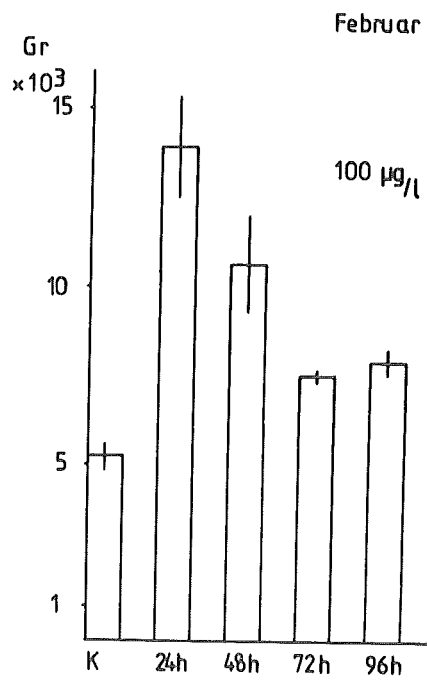


Abb. 20

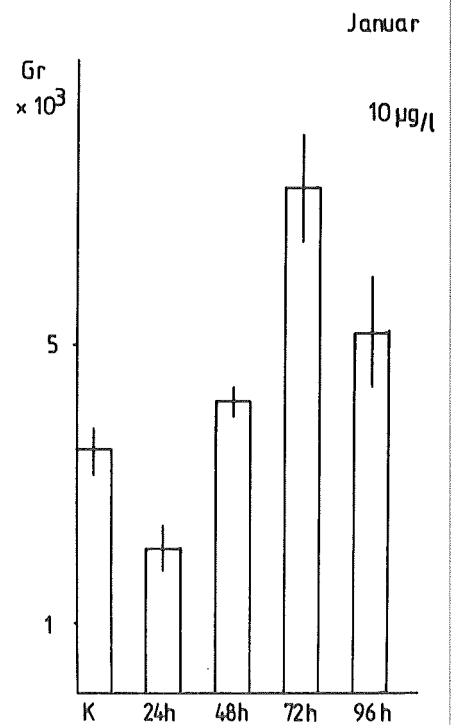


Abb. 21

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7211)

Entwicklung und Erprobung eines Verhaltenstestes
mit Fischen im Durchfluß zur Beurteilung der sub-
akuten und chronischen Toxizität sowie Untersuchung
des Einflusses von Randbedingungen

von

Peter Bemmer

Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft
der Universität Hamburg

Vorhaben- und Institutsleiter

Prof. Dr. K. Liljelund

März 1982

Zusammenfassung

Mit Hilfe der Streifenzyklindertechnik wurde eine Methode entwickelt und erprobt, die zur Früherkennung und Messung subletaler sowie chronischer Schädigungen bei Fischen, hervorgerufen durch chlorierte Kohlenwasserstoffe, beitragen sollte. Das Gerät wurde während der gesamten Untersuchung technisch ständig weiterentwickelt und damit neuen Erfahrungen fortlaufend angepaßt.

Folgende Parameter waren variierbar: reizauslösendes umlaufendes Muster sowie dessen Geschwindigkeit, Drehrichtung, Schwimmkanalbreite, Schadstoffkonzentrationen im Wasser, Wassertemperatur.

In den Versuchen wurden mehrere Fischarten verwendet, Goldorfen (*Leuciscus idus* (L.)), Karpfen (*Cyprinus carpio* L.), Elritzen (*Phoxinus phoxinus* (L.)) und Forellen (*Salmo gairdneri* RICHARDSON).

Die Registrierung ihrer Umläufe erfolgte mit Hilfe der Magnetmarkierungsmethode automatisch.

Trotz mehrerer in ihren Ansätzen differierender Versuchsanordnungen konnten keine reproduzierbaren Meßergebnisse ermittelt werden, die eine Standardisierung zugelassen hätten. Der Grund hierfür scheint darin zu bestehen, daß die individuelle Reaktion der Fische auf einen optischen Reiz zu unterschiedlich ist, um mit dieser Methode subletale Schadwirkungen zu quantifizieren.

Summary

A method was developed and tested employing the banded cylinder technique to help in the early diagnosis and evaluation of sub-lethal and chronic injury caused by chlorinated hydrocarbons in fish. The banded cylinder device was continually improved technically during the entire course of the investigation as experience was gained.

The following parameters could be varied: the pattern used as a stimulus and its speed of rotation, the direction of rotation, the width of the swimming channel, the concentration of the contaminants in the water, and the water temperature.

Several fish species were used in the experiments:

ide (*Leuciscus idus* (L.)), carp (*Cyprinus carpio* L.), minnows (*Phoxinus phoxinus* (L.)) und trout (*Salmo gairdneri* RICHARDSON).

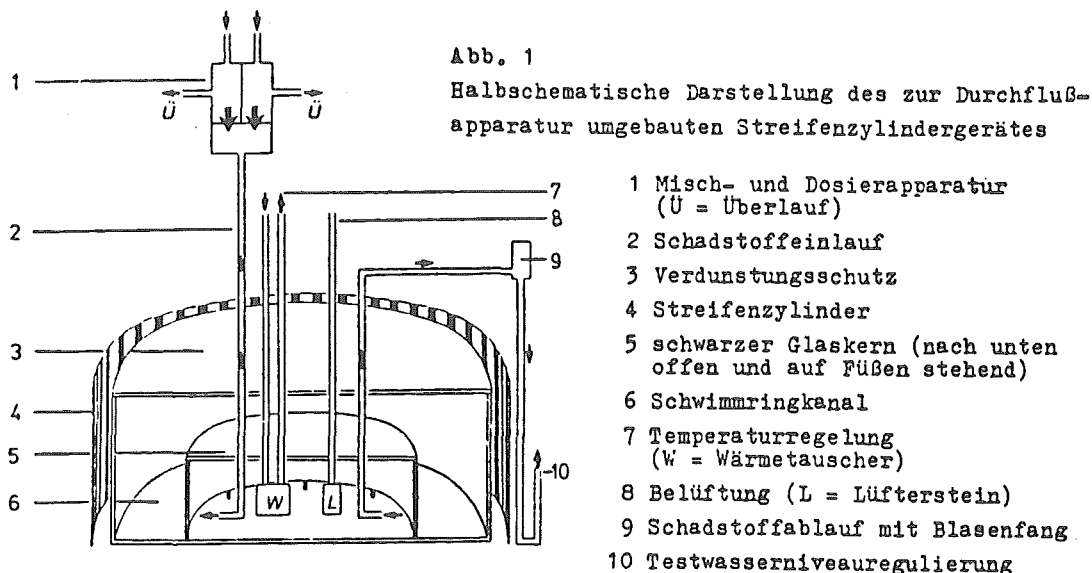
The movements of the fish were recorded automatically using the magnetic marking method.

Although several different experimental procedures were employed, none could be found that provided reproducible results and showed promise of becoming a standard method. The reason seems to be that there is too much variability among the reactions of individual fish to a visual stimulus to use this parameter for the quantitative evaluation of sublethal injury or intoxication.

Mit Hilfe einer Streifenzyylinderapparatur sollten meßbare Kriterien zur Prüfung subletaler und chronischer Schadwirkungen bei Fischen festgestellt werden.

Die Funktion dieser Anlage basiert auf der Fähigkeit von Fischen, sich in Gewässern optisch zu orientieren und einen Standort gegen eine Strömung durch ausgleichendes Schwimmen beizubehalten. Geräte, die sich diese Eigenschaft zunutze machen, werden seit langem bei sinnesphysiologischen Untersuchungen verwendet.

Eine halbschematische Zeichnung der Apparatur ist in Abbildung 1 dargestellt.



In der ursprünglichen Konzeption handelte es sich dabei im Prinzip um ein rundes Glasbecken, in das ein gleichfalls runder Glaskern dergestalt eingesetzt wurde, daß sich ein wasser-gefüllter Ringkanal ergab, in dem die Versuche stattfanden. Vorrichtungen für Wasseraustausch, Temperaturregelung und Belüftung waren im Kerninneren untergebracht. Um den Ringkanal rotierte ein weiterer Zylinder mit einem Muster, das die Fische durch diesen optischen Reiz zum Mitschwimmen anregen sollte. In der Abbildung ist eine bereits modifizierte Anlage dargestellt, die späterhin Verwendung fand. Auf die Gründe für diese Weiterentwicklung wird im Folgenden eingegangen.

Maßnahmen zur Intensivierung des optischen Reizes

Es zeigte sich sehr bald, daß die Versuchstiere dem optischen Reiz ausweichen konnten. Daher war es erforderlich, das Gerät ständig neuen Erkenntnissen und Erfahrungen anzupassen und zu optimieren.

Anstelle des bis dahin verwendeten durchsichtigen Kerns wurde ein schwarzer eingesetzt, der von der Innenseite herrührende ablenkende Einflüsse abschirmte. Dies wiederum machte eine schattenfreie Ausleuchtung des Schwimmkanals erforderlich.

Ferner wurde durch Vergrößerung des Kernradius eine Verengung des Schwimmkanals erreicht - zunächst auf 10 cm, später auf 2,5 cm Breite - um die Fische näher an den umlaufenden Streifen heranzuführen.

Eine weitere Verstärkung des optischen Reizes sollte sich durch Anbringung eines gleich gerasterten umlaufenden Streifenmusters auch im Schwimmkanalbodenbereich ergeben. Mehrere Muster wurden erprobt, die sich in Form und Farbe voneinander unterschieden. Für die Versuche wurde eine Struktur von 1 cm breiten schwarzen senkrechten Streifen auf weißem Grund in 3 cm Abstand voneinander ausgewählt.

Optimierung der Meßmethodik

Ebenfalls schrittweise erfolgte die Optimierung der Meßmethodik. Nachdem zunächst Ergebnisse über das Schwimmverhalten von Einzelfischen und Gruppen sowie deren Geschwindigkeiten durch direkte Beobachtung ermittelt wurden, bot sich als Methode zur kontinuierlichen Messung der Folgeleistung die Magnetmarkierung an. Bei diesem Verfahren wird das Feld eines am Fisch befestigten Magneten mit Hilfe einer Förster-Differenzsonde registriert. Dadurch wurde es möglich, die Umläufe von markierten Fischen ständig zu überwachen und zu zählen.

Der Anwendung dieses Verfahrens mußte die Entwicklung einer möglichst streßarmen Markierungsmethode vorangehen. Dies ließ sich durch Einsetzen der an rostfreien Stahlnadeln befestigten Magnete in die Dorsalmukulatur erreichen. In Anbetracht der geringen Größe der Versuchstiere mußten die Magnete

äußerst leicht sein. Erst die Verwendung leistungsstarker Kobalt-Samarium-Magnete ließ eine sichere Registrierung zu, ohne daß derart markierte Fische eine erkennbare Abweichung in Leistung und Verhalten von unmarkierten zeigten. Die Tiere konnten unmittelbar nach dem Markieren im Versuch eingesetzt werden, benötigten also keine Eingewöhnungszeit.

Als weitere Verbesserung wurden elektronische Impulszählgeräte verwendet. Dadurch bestand die Möglichkeit, mehrere markierte Fische zugleich in einem Versuch zu registrieren.

Festlegung von Randbedingungen

Die Problematik des in statischen Versuchsanordnungen auftretenden Schadstoffschwundes, der die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sehr erschwert, machte es erforderlich, die Anlage auf die im Vorhaben 03 7234 beschriebene Weise für den Durchfluß einzurichten.

Der Lösungsaustausch geschah zunächst im Kerninneren, es zeigte sich jedoch bald, daß durch eine Erhöhung der Anzahl von Versuchsfischen im Schwimmkanal ein Gefälle der Schadstoffkonzentration im Wasser sowie eine organische Belastung durch Stoffwechselendprodukte auftrat. Letzteres war offensichtlich der Grund für eine deutliche Erniedrigung der Letalitätsgrenze. Der zu geringe Lösungsaustausch wurde durch Direkteinleitung frischer Schadstofflösung an mehreren Stellen des Schwimmkanals behoben.

Ferner wurde die Wassertemperatur von ursprünglich 20°C auf die für Goldorfen optimale Temperatur von 17°C herabgesetzt, die nicht nur über das ganze Jahr leichter einstellbar war, sondern auch Elritzen und Forellen als Versuchstiere zuließ.

Entwicklung von Prüfparametern mit dem Ziel einer Standardisierung

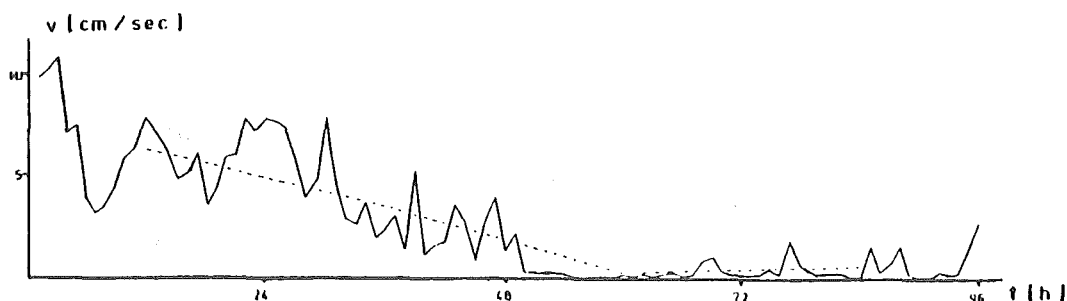
Es wurden zunächst Einzelfische, später mehrere zugleich eingesetzte Goldorfen hinsichtlich ihrer Adaptationszeit, d.h. der Zeit bis zum Beginn gleichmäßigen Mitschwimmens, beob-

achtet. Erst die Einführung der automatischen Registriereinrichtung in Verbindung mit der Magnetmarkierungsmethode ermöglichte es, auch die Schwimmleistung einer Gruppe zu beurteilen. Aus den Erfahrungen dieser Experimente ergab sich die in späteren Versuchen beibehaltene geeignetste Rastermustersgeschwindigkeit von 25 cm/sec als Standard.

Zunächst wurden Versuchsserien mit unterschiedlichen Fischarten über 48 Stunden in kontaminiertem und unkontaminiertem Wasser durchgeführt. Da die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit nicht befriedigten, wurde die Anzahl der eingesetzten Fische sowie die der davon markierten erhöht. Außerdem wurde die Versuchsdauer verlängert.

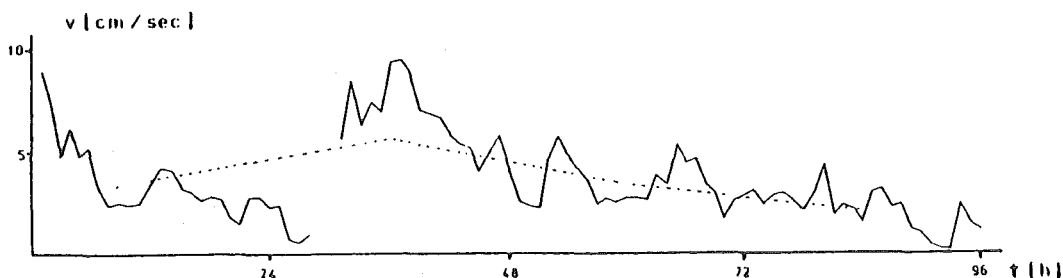
Nach Belastbarkeitsprüfungen über 144 Stunden Dauerleistung erwiesen sich Karpfen und Forellen für diese Versuchsanordnung als wenig geeignet.

Goldorfen zeigten während 96 Stunden, abhängig von der Höhe der γ -HCH-Konzentration im Wasser, zeitliche Verschiebungen ihrer Leistungsmaxima.



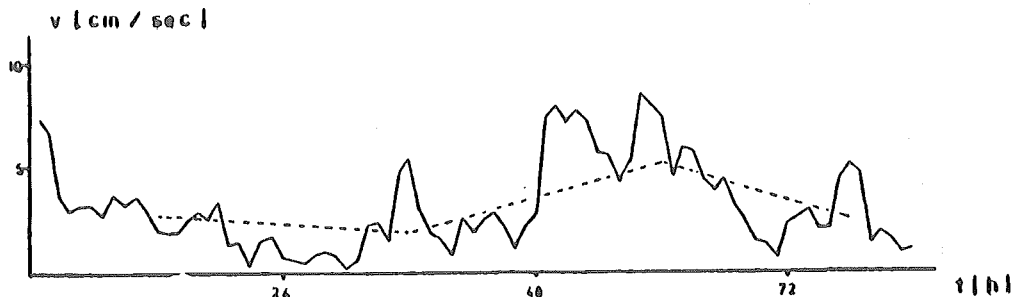
Folgereaktion von Goldorfen in der Streifenzyylinderapparatur bei einer vorgegebenen Streifengeschwindigkeit von 25 cm/sec in schadstoffreiem Testwasser.

— gemittelte Schwimmgeschwindigkeit pro Stunde
- - - - - gemittelte Schwimmgeschwindigkeit pro Tag



Folgereaktion von Goldorfen in der Streifenzyylinderapparatur bei einer vorgegebenen Streifengeschwindigkeit von 25 cm/sec und einer Lindankonzentration von 20 µg/l Testwasser.

— gemittelte Schwimmgeschwindigkeit pro Stunde
- - - - - gemittelte Schwimmgeschwindigkeit pro Tag



Folgereaktion von Goldorfen in der Streifenzyylinder-
apparat bei einer vorgegebenen Streifengeschwindig-
keit von 25 cm/sec und einer Lindankonzentration von
30 µg/l im Testwasser.

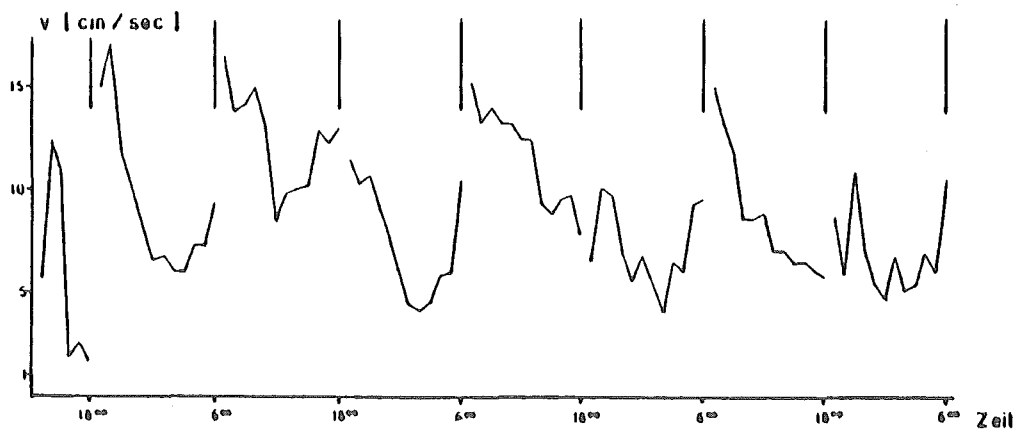
— gemittelte Schwimmggeschwindigkeit pro Stunde
- - - - - gemittelte Schwimmggeschwindigkeit pro Tag

Abb. 2

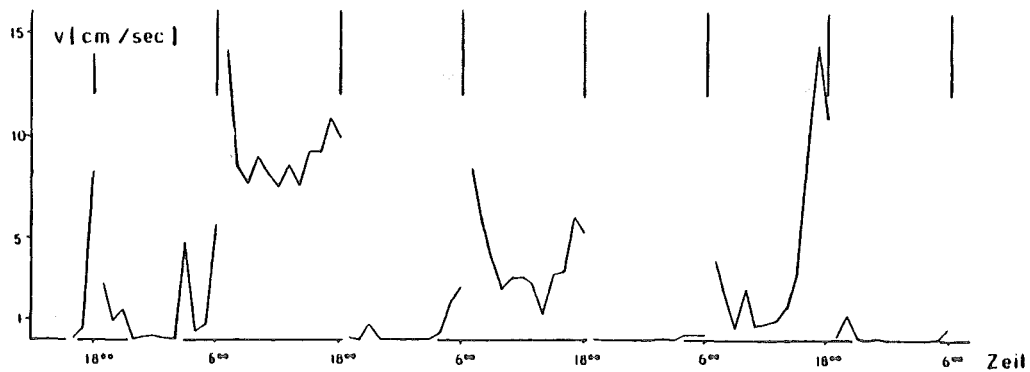
Diese Ergebnisse ließen sich jedoch mit Goldorfen aus anderen
späteren Lieferungen nicht reproduzieren.

Da sich eine Abhängigkeit der Folgeleistung von der Tageszeit
anzudeuten schien, wurde eine nächtliche Dunkelphase von 12
Stunden als sinnvoll angesehen. Auch dieses Kriterium erwies
sich als unbrauchbar, da in einigen Serien die Fische auch
nachts, also ohne optischen Reiz, hohe Schwimmleistungen er-
brachten.

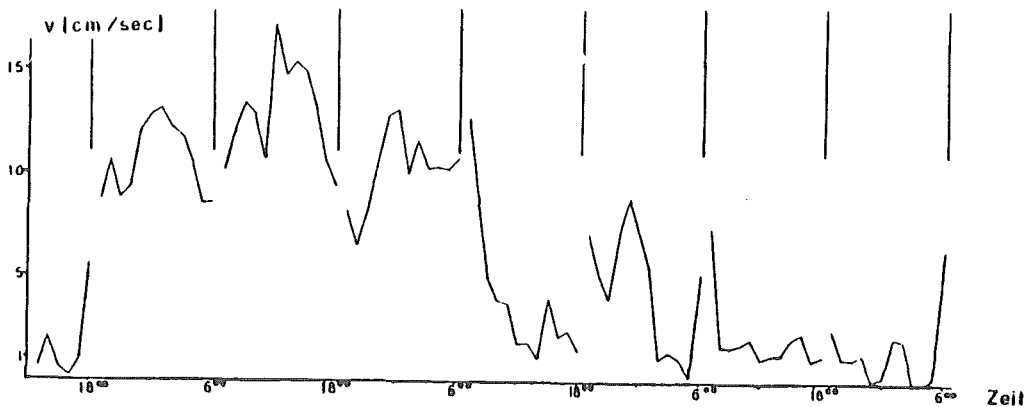
Bei diesen Versuchen zeigte es sich jedoch, daß jeweils nach
Wiedereinsetzen des Reizes innerhalb der ersten Stunde die
beste Folgeleistung beobachtet wurde.



Folgereaktion von Goldorfen in der Streifenzyylinderapparat
bei einer vorgegebenen Streifengeschwindigkeit von 25 cm/sec
in schadstoffreiem Testwasser.
Die Messung der durchschnittlichen Schwimmggeschwindigkeit pro
Stunde wurde, beginnend um 6:00 des zweiten Tages, jeweils
von 6:00 bis 18:00 durchgeführt. Von 18:00 bis 6:00 herrschte
Dunkelheit.



Folgeraktion von Forolien in der Streifenzyylinderapparatur bei einer vorgegebenen Streifengeschwindigkeit von 25 cm/sec in schadstofffreiem Testwasser. Die Messung der durchschnittlichen Schwimmgeschwindigkeit pro Stunde wurde, beginnend um 6.00 des zweiten Tages, jeweils von 6.00 bis 18.00 durchgeführt. Von 18.00 bis 6.00 herrschte Dunkelheit.



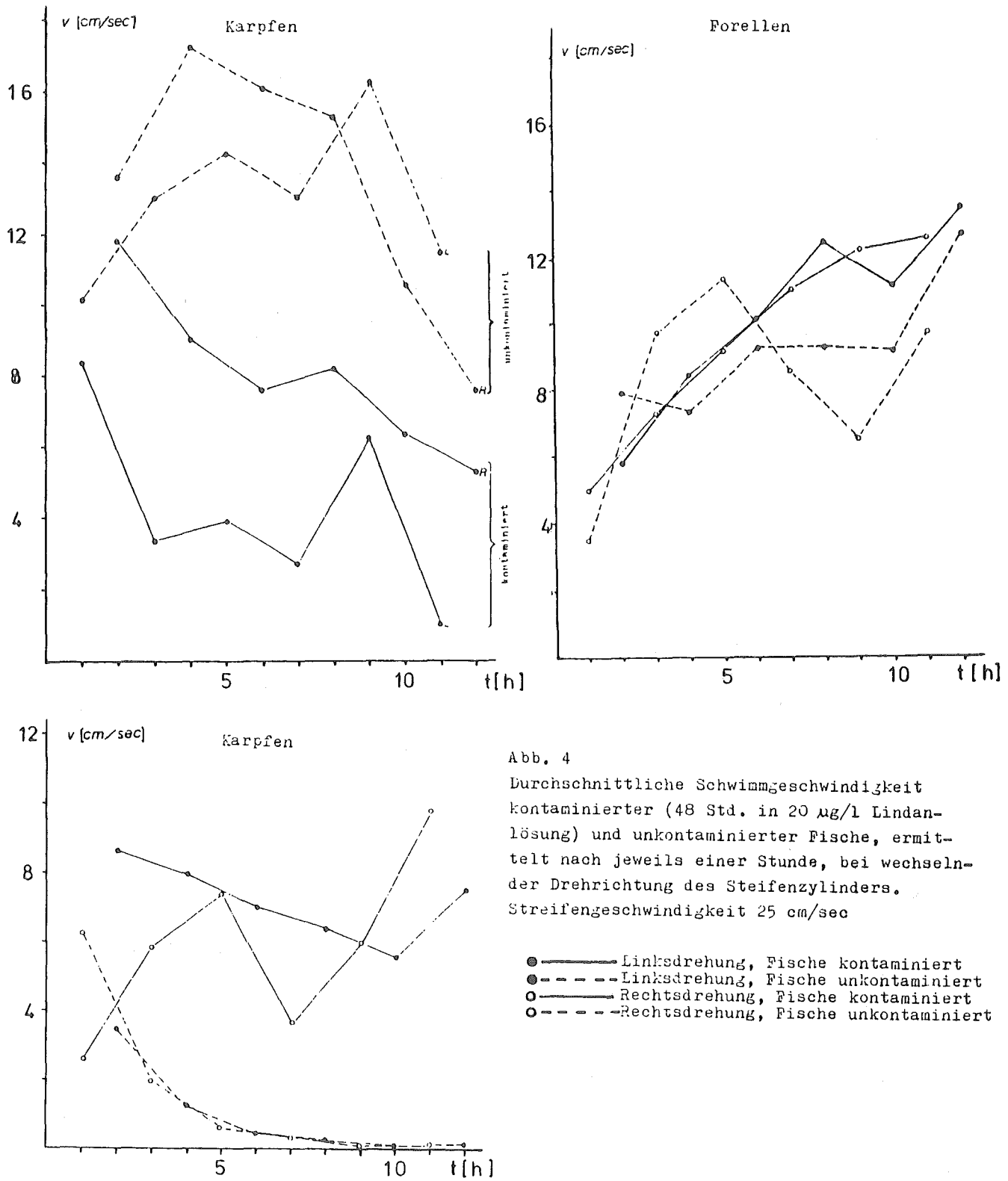
Folgeraktion von Goldfischen in der Streifenzyylinderapparatur bei einer vorgegebenen Streifengeschwindigkeit von 25 cm/sec in einer Lindankonzentration von 10 µg/l Testwasser. Die Messung der durchschnittlichen Schwimmgeschwindigkeit pro Stunde wurde, beginnend um 6.00 des zweiten Tages, jeweils von 6.00 bis 18.00 durchgeführt. Von 18.00 bis 6.00 herrschte Dunkelheit.

Abb. 3

Dies wurde dahingehend gedeutet, daß das Nachlassen der Schwimmleistung im Versuchsverlauf nicht nur auf eine Schwächung der Tiere zurückzuführen ist, sondern auch auf eine gewöhnungsbedingte Anpassung an den Reiz. Es wurde daher die Zahl der Anfangsreize durch stündlichen Wechsel der Drehrichtung erhöht. Dies erwies sich als gangbarer Weg, um die Reizgewöhnung auszuschalten (Abb. 4).

Jedoch zeigte sich bei der Untersuchung unterschiedlicher Fischarten - kontaminiert und unkontaminiert - kein einheitliches Bild in der Folgeleistung.

Diese hinsichtlich der Beurteilung des Schwimmverhaltens unterschiedlicher Fischarten an sich positiven Ergebnisse waren jedoch in dieser Deutlichkeit nicht immer reproduzierbar und ließen somit eine Standardisierung nicht zu.



Als Folge davon wurde darauf verzichtet, eine subletale Schadwirkung durch die Änderung von Schwimmleistungen nachweisen zu wollen.

Das Gerät wurde nun verwendet, um eine mögliche Änderung des Akkumulations- und Eliminationsverlaufes durch qualitative Erhöhung der Bewegungsaktivität zu untersuchen. Hierbei zeigte es sich, daß bewegungsaktive Fische in der Tendenz geringere Biokonzentrationsfaktoren für Lindan erreichten als in Ruhe befindliche. HCB-belastete Fische eliminierten den Schadstoff in Ruhe schneller.

Folgerungen aus den Untersuchungen

Es hat sich gezeigt, daß die Streifenzyklindertechnik in der hier modifizierten Form geeignet ist, Bewegungsaktivität bei Fischen auf praktikable Art zu messen.

Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen wurde jedoch durch Parameter erschwert, die hauptsächlich in den Fischen selber zu suchen sind. Zu nennen ist insbesondere die jahreszeitliche Änderung der Kondition der Versuchsfische sowie ein individuell abweichendes Verhalten von Einzelfischen, das sich störend auf das Verhalten der ganzen Gruppe auswirken kann.

Außerdem scheint die Stimulierung zu einer gleichmäßigen und dauerhaften Schwimmleistung durch einen optischen Reiz allein nicht gewährleistet zu sein. Daher kann gesagt werden, daß mit der hier praktizierten Form der Streifenzyklindertechnik keine standardisierbaren Bedingungen geschaffen werden konnten.

Versuchsansätze, die sich das rheotaktische Verhalten der Fische zunutze machen, scheinen erfolgversprechender zu sein. Es muß jedoch möglich sein, dabei grundsätzlich das dynamische Testverfahren miteinzubeziehen, um Schadstoffkonzentrationen konstant halten zu können.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7234)

"Entwicklung und Erprobung eines Fischtestes im Durchfluß zur vergleichbaren Quantifizierung der Bioakkumulation und seine Beeinflussung durch Randbedingungen"

von

Dietmar Langer

und

Werner Schütz

Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft
der Universität Hamburg

Vorhaben- und Institutsleiter:

Prof. Dr. K. Lillelund

März 1982

Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen zur Akkumulation und Elimination von Hexachlorbenzol, Lindan, Pentachlorphenol, Dioctylphthalat, Trichlorethylen und Trichlorbenzol durchgeführt, wobei Goldorfen, Forellen, Karpfen und Elritzen als Versuchsfische eingesetzt wurden.

In einem statischen Testsystem traten hohe Konzentrationsverluste im Testwasser auf. Zur Konstanthaltung der Versuchsparmeter wurde eine Durchfluß- und Dosieranlage entwickelt. Diese gestattete es, auch Langzeitversuche durchzuführen. Die Schadstoffe wurden über das Testwasser oder die Nahrung appliziert.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Einlagerung und Ausscheidung der untersuchten Stoffe sind in hohem Maße von dem Fettgehalt der Versuchstiere abhängig.
- Sowohl bei der Kontamination über das Wasser als auch über das Futter wird, abhängig von stoffspezifischen Eigenschaften, ein Akkumulationsplateau erreicht.
- Insgesamt läßt sich die Schadstoffverteilung in den Organen mit deren Fettgehalt korrelieren.
- Die Untersuchungen mit isoliertem Fischtran und lebenden Fischen stimmten in ihren Ergebnissen weitgehend überein, da sich die Schadstoffverteilung als Gleichgewicht zwischen zwei Phasen beschreiben läßt.

Summary

Investigations on the accumulation and elimination of hexachlorobenzol, lindane, pentachlorophenol, dioctylphthalate, trichloroethylene and trichlorobenzol were conducted using ide, trout, carp, and minnows as experimental animals.

The concentrations of the chemicals rapidly decreased in static test systems, so a flow-through system and dosage regulator were developed to hold the experimental parameters constant. This also permitted long-term experiments. The contaminant was applied either in the water or in the food.

The following conclusions were reached:

- Storage and elimination of the substances applied are to a great extent dependent on the fat content of the animal.
- Whether the contaminants were administered with the water or with the food, an accumulation plateau was reached, dependent upon the specific qualities of the chemicals.
- A general correlation between the distribution of the contaminant among the organs and their fat content was observed.
- A general agreement between the results obtained using isolated train-oil and living fish indicated that the distribution of the contaminants can be described as an equilibrium between two phases.

Die Vielzahl der in Gewässer gelangenden Stoffe macht es erforderlich, ihren Verbleib und ihre Auswirkungen auf die Umwelt zu erfassen. Schadstoffkonzentrationen in Freilandgewässern sind oft so gering, daß akute Vergiftungen nicht auftreten, Schäden somit nicht unmittelbar sichtbar werden. Das ist insbesondere bei einem Phänomen der Fall, das man als Bioakkumulation bezeichnet. Bei diesem Vorgang, dessen Auswirkungen auf die Gesundheit und auf das Populationsgeschehen von aquatischen Organismen noch weitgehend unbekannt ist, können Chemikalien über das Wasser bzw. die Nahrung in die Organe und das Fettgewebe aufgenommen und dort angereichert werden.

Erste Kenntnisse sind durch Felduntersuchungen erlangt worden. Aufgrund der Vielfalt der im Freiland vorkommenden Kombinationsmöglichkeiten von Schadstoffen war es dringend geboten, diese Erscheinung zunächst unter Laboratoriumsbedingungen nachzuvollziehen. Zweckmäßig war es dabei, typische Vertreter von Schadstoffklassen und ausgewählte Organismen bezüglich dieser Fragestellung modellhaft zu untersuchen.

1. Methodisches Vorgehen

1.1. Schadstoffe

Aus der Referenzchemikalienliste wurden die Stoffe Hexachlorbenzol, Pentachlorphenol, Dioctylphthalat, Trichlorethylen und Trichlorbenzol bearbeitet. Zusätzlich wurde als interner Standardstoff γ -HCH (Lindan) in die Untersuchungen mit einbezogen. Aufgrund der gut bekannten Anreicherungskinetik dieses Stoffes konnte ein eventuell abweichendes Akkumulationsverhalten anderer Stoffe besser eingeschätzt werden.

Physikalisch-chemische Daten der untersuchten Stoffe:

Hexachlorbenzol (HCB)

fest, Löslichkeit: ca. 5 μ g/l (ppb)
LC 50: 100 mg/kg
Verwendung: Fungizid, Holz-Saat-Beize

Pentachlorphenol (PCP)

fest, Löslichkeit: ca. 14 mg/l (ppm)
LC50: 0,04 - 0,2 mg/l
Verwendung: Herbizid, Insektizid,
Entlaubungsmittel, antibakteriell
Holzschutz-Fungizid

Dioctylphthalat (DOP) = Diethylhexylphthalat (DEHP)

flüssig, Löslichkeit: ca. 900 μ g/l (ppb)
Toxizität gering
Verwendung: Weichmacher in Kunststoff und Lack,
entsteht bei Müllverbrennung

1,2,4, Trichlorbenzol

flüssig, Löslichkeit: ca. 30 mg/l (ppm)
TL₉₆: 10 - 1 mg/l

Lindan(γ -HCH)

fest, Löslichkeit: ca. 7mg/l (ppm)
LC 50: 8 - 80 μ g/l
Verwendung: Insektizid

Trichlorethylen (Tri)

flüssig, Löslichkeit: 1,1g/l
LC 50: 200 mg/l
Verwendung: Reinigung und Entfettung

1.2. Versuchsfische

Die Versuche wurden mit Goldorfen (*Leuciscus idus* (L.)), Elritzen (*Phoxinus phoxinus* (L.)), Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Forellen (*Salmo gairdneri* RICHARDSON) durchgeführt. Es wurden nur gesunde und parasitenfreie Fische verwendet. Die genannten Arten werden national und international häufig als Testfische eingesetzt. Zudem wird ihnen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Schadstoffeinflüsse zugeschrieben. Stichprobenartig durchgeführte Untersuchungen bezüglich einer Belastung mit gaschromatographisch nachweisbaren Schadstoffen ergaben bei den herrschenden Meßbedingungen keine Vorkontamination.

1.3. Versuchsmethoden

Die Vorratshälterung und eine vor Versuchsbeginn ein- bis zweiwöchige Akklimatisation der Fische erfolgte im Frischwasserdurchfluß in 250 l fassenden Glasaquarien. Testfische wurden nach dem Zufallsprinzip entnommen, um eine durch Selektion bedingte fortschreitende Qualitätsänderung möglichst auszuschließen.

Die Versuchsaquarien waren mit Glasplatten abgedeckt. Durch darin eingelassene Bohrungen konnte der über dem Testwasser stehende Luftraum mit einer Abluftanlage verbunden werden. Diese Maßnahme erscheint aus Sicherheitsgründen, insbesondere bei der Verwendung leicht flüchtiger toxischer Substanzen, angebracht.

Als Testgefäße dienten Vollglasaquarien, die in einem offenen Wasserbad angeordnet waren. Mit einem darin installierten kryostatgekoppelten Wärmetauscher konnte die Temperatur des Testwassers geregelt werden. Sie betrug für alle getesteten Fischarten 17 ± 1 °C.

Die Anzahl der pro Versuchszeiteinheit untersuchten Fische betrug bei den Goldorfen 5, bei den anderen Arten 2 bis 5, je nach Körpergewicht. Die Fische der einzelnen Proben wurden

jeweils gemeinsam aufgearbeitet. Die erste Probennahme erfolgte in der Regel nach dreistündiger Expositionsdauer, die weiteren jeweils nach Verdoppelung des Zeitintervalls bis 192 Stunden. In einzelnen Fällen wurden Langzeitversuche bis zu 51 Tagen Dauer durchgeführt.

Die Fische wurden nach Versuchsende getötet, in Aluminiumfolie verpackt und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Versuche im dynamischen Testsystem wurden mit Hilfe der in Abb. 1 schematisch dargestellten Versuchsanlage durchgeführt. Sie gewährleistete eine hohe Konstanz in der Schadstoffkonzentration des Wassers und der Durchflußmenge in den Testaquarien. Ferner war der gleichzeitige Einsatz mehrerer Schadstoffe möglich.

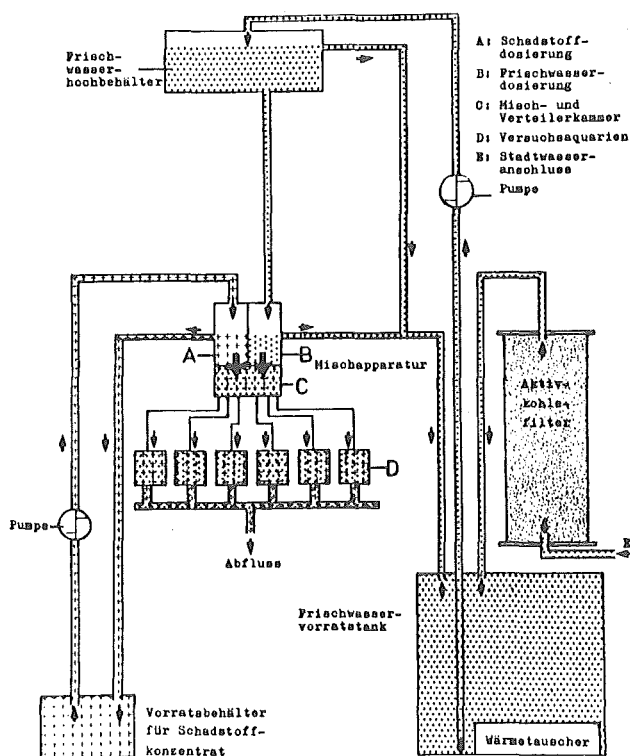


Abb. 1: Schematische Übersicht der Versuchsanlage

Das Prinzip der Misch- und Dosieranlage basiert in seiner Wirkungsweise auf den Gesetzmäßigkeiten des hydrostatischen Druckes, wobei kalibrierte Kanülen die jeweils benötigten Mengen von Schadstoffkonzentrat und Frischwasser bestimmen. Die Herstellung einer Stammlösung war im Falle schlecht wasserlöslicher Stoffe nur unter der Verwendung von Lösungsvermittlern möglich. Zum Einsatz kamen Äthanol und tertiäres Butanol. Beide Stoffe haben Nachteile. Äthanol induziert extrem starkes Bak-

terienwachstum, Butanol neigt bei Raumtemperatur zum Auskristallisieren. Bei dem Einsatz flüssiger Schadstoffe bestand die Schwierigkeit darin, die wässrige Stammlösung von dem reinen Stoffüberschuß zu trennen. In den unter Verwendung von Lösungsvermittlern durchgeführten Versuchen wurde die natürliche Löslichkeit der Stoffe jedoch nie überschritten.

Die Untersuchungen unter statischen Testbedingungen wurden in ihren Grundzügen bei den im Goldorfentest angegebenen Bedingungen durchgeführt. Um eine erhöhte Anreicherung von Stoffwechselendprodukten und zusätzliche Zehrungsprozesse im Wasser zu vermeiden, mußte während der Versuchsdauer auf eine Fütterung verzichtet werden. Langzeitversuche konnten somit nicht durchgeführt werden.

Versuche mit kontaminiertem Futter sollten zeigen, ob bezüglich der Aufnahmekinetik, der Höhe des Schadstoffplateaus und der Eliminationsgeschwindigkeit Unterschiede zu den ermittelten Daten bei der Kontamination über das Wasser auftraten. Wegen der Schwierigkeit, genügend hohe und gleichbleibende Schadstoffgehalte in Futterorganismen zu erhalten, wurde kontaminiertes Trockenfutter verwendet.

Bei Fütterungsversuchen muß eine vollständige Aufnahme der angebotenen Futtermenge gewährleistet sein, wobei jedoch zu bedenken ist, daß durch individuell unterschiedliche Freßlust der Versuchstiere Aufnahmedifferenzen auftreten können.

1.4. Rückstandsanalytik

Die für rückstandsanalytische Untersuchungen häufig benutzte Methode der Kaltextraktion erlaubt es, den Lipid- und Schadstoffgehalt der Versuchstiere in einem Arbeitsgang zu ermitteln. Die hier beschriebene Aufarbeitungsmethode wurde von Diercking (unveröffentlicht) für dieses Vorhaben weiterentwickelt bzw. modifiziert.

Die tiefgefrorenen Fische werden homogenisiert und danach möglichst verlustfrei in einen Erlenmeyerkolben überführt. Nach Zugabe von ca. 5 g Natriumsulfatanhydrid pro Gramm Fischeinwaage (Entwässerung) und 80 ml Hexan/Aceton (Mischungsverhältnis 2:1) erfolgt 12- bis 15-stündige Kaltextraktion.

Der Kaltextrakt wird filtriert und der Aufschlußrückstand mit Hexan/Aceton mehrfach nachgewaschen. Die Lösungsmittel werden im Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach Trocknung bei max. 105 °C wird die extrahierte Fettmenge gravimetrisch ermittelt. Für die gaschromatographische Bestimmung des Schadstoffgehaltes der Probe muß das im Extrakt enthaltene Fett durch einen Reinigungsvorgang ("clean up" Chromatographiesäule mit schwefelsäurebenetztem Celite) entfernt werden. Das Eluat ist frei von Verunreinigungen und kann direkt oder nach Verdünnungsschritten für die Messung benutzt werden. Für die flüchtigen (Trichloräthylen) bzw. nicht säurebeständigen Stoffe (DOP) mußte diese Methode modifiziert werden.

Die Bestimmung des Schadstoffgehaltes im Wasser erfolgte durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln.

Meßgeräte waren zwei Gaschromatographen mit Elektroneneinfangdetektoren (ECD). Die Wiederauffingungsraten für die Schadstoffe lagen bei 82 bis 95 %, der Fehler bei der Fettbestimmung betrug ± 2 %.

1.5. Bezugssysteme

Es ist naheliegend, daß differierende Schadstoffkonzentrationen im Wasser verschieden hohe Anreicherungswerte in Organismen zur Folge haben. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, werden diese daher in der Literatur häufig als Biokonzentrationsfaktoren (BCF) ausgedrückt. Es handelt sich hierbei um das Verhältnis zwischen dem Schadstoffgehalt im Organismus (in der Regel Schadstoffmenge pro Gramm Organismus) und dem des Wassers.

Bei der Auswertung unserer Ergebnisse erwies es sich als nützlich, die von den Versuchsfischen eingelagerte Schadstoffmenge auf deren Fettgehalt zu beziehen, da die untersuchten Stoffe überwiegend lipophil waren. Dieser Bezug hatte den Vorteil, daß der Schadstoffgehalt unterschiedlicher Arten und verschiedenen konditionierter Fische bei ansonsten weitgehend ähnlichen Versuchsbedingungen vergleichbar wurde.

Als Konsequenz wurde die Berechnungsweise der Biokonzentra-

tionsfaktoren abgeändert. Statt des Naßgewichtes wurde der Fettgehalt der Versuchstiere als Bezug eingeführt:

$$BCF = \frac{\mu\text{g Schadstoff} / \text{mg Fett}}{\mu\text{g Schadstoff} / \text{l Wasser}} \times 10^6$$

2. Ergebnisse

2.1. Anreicherung von Schadstoffen in Fischen bei statischen Versuchsbedingungen

Die Aufnahme von Schadstoffen durch die Fische, Verdunstungsverluste sowie Bindungsvorgänge an den Aquarienwänden führten bei statischen Akkumulationsversuchen zu einer ständigen Erniedrigung der Substanzkonzentrationen im Testwasser. Für Lindan, PCP und DOP betrug der Schwund innerhalb von 48 Stunden etwa 50 %, Trichlorethylen und HCB waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Aufgrund dieser erheblichen Verminderung der Schadstoffkonzentrationen im Wasser erwies sich die Durchführung eines Fischtestes unter kontrollierten Bedingungen mit den zur Rede stehenden Stoffen als wenig geeignet.

Reproduzierbare Anreicherungsversuche konnten nur im dynamischen Testsystem durchgeführt werden.

2.2. Anreicherung von Schadstoffen in Fischen aus dem Wasser bei dynamischen Versuchsbedingungen

y-HCH (Lindan)

Eine Auswertung entsprechender Versuche hat gezeigt, daß die Höhe der Schadstoffeinlagerung in den Fischen in erster Linie von der Pestizidkonzentration im Testwasser abhängig ist, wobei im untersuchten Konzentrationsbereich - zwischen 10 µg und 50 µg pro Liter Wasser - für die Versuchsdauer von 96 Stunden folgender linearer Zusammenhang besteht:

$$y = 0,0165 + 0,0126x$$

$$r = 0,9797$$

$$n = 6$$

Werden verschiedene Fischarten hinsichtlich ihrer Lindananreicherung untersucht, so treten artspezifische Akkumulationsunterschiede nur bei der Verwendung des Bezugssystems "Naßgewicht"

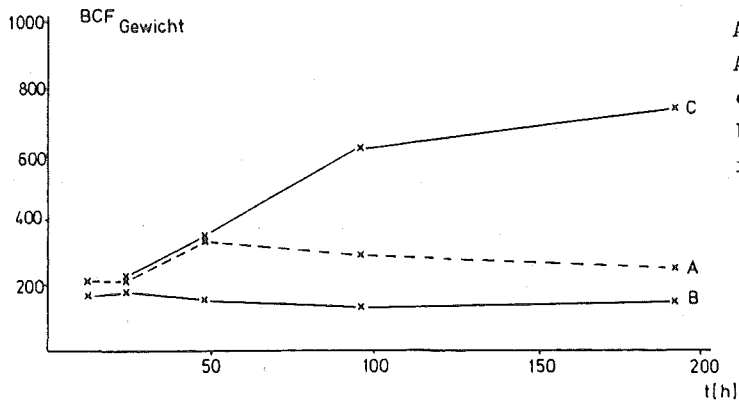


Abb. 3
Anreicherung von Lindan in ein- und zweisömmrigen Goldorfen bei Bezug auf den Biokonzentrationsfaktor Gewicht

A, B einsömmrige,
C zweisömmrige Goldorfen

Zwischen den Versuchsgruppen (A, B und C) besteht ein deutlicher Unterschied in der Anreicherungshöhe, wobei bei den schwersten Fischen die höchsten BCF ermittelt wurden. Auffällig ist, daß die Fische der Versuchsgruppe B die niedrigsten Akkumulationswerte aufweisen, obwohl ihr Durchschnittsgewicht über dem der Versuchsgruppe A liegt. Berücksichtigt man jedoch die mittleren relativen Fettgehalte der Gruppen A bis C, so lassen sich die unterschiedlichen Anreicherungshöhen erklären.

A = 22,3 mg Fett / g Fisch
B = 15,6 mg Fett / g Fisch
C = 52,9 mg Fett / g Fisch

Bezieht man den Biokonzentrationsfaktor auf den Fettgehalt der Fische, so ergibt sich der in Abb. 4 dargestellte Anreicherungsverlauf.

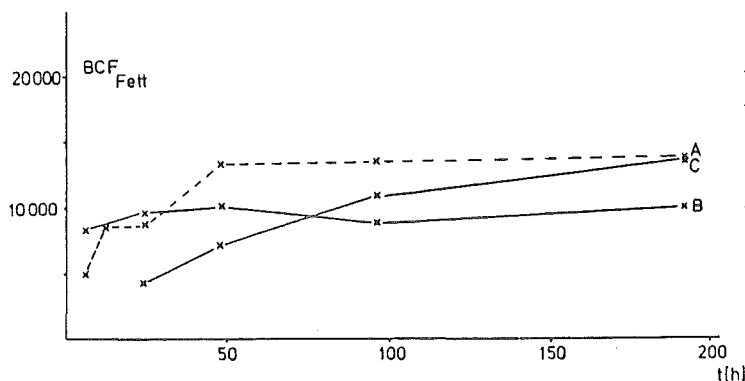


Abb. 4
Anreicherung von Lindan in ein- und zweisömmrigen Goldorfen bei Bezug auf den Biokonzentrationsfaktor Fett

A, B einsömmrige,
C zweisömmrige Goldorfen

Im Gegensatz zur Versuchsgruppe B erreichen die Gruppen A und C, wenn auch in unterschiedlichen Zeiten - 48 Stunden bzw. 192 Stunden - gleiche Anreicherungshöhen. Hierbei handelt es sich, wie die Auswertung aller mit Lindan durchgeführten Versuche ergab, um die maximal erreichbaren Biokonzentrationsfaktoren, also um ein Gleichgewicht zwischen den Schadstoffgehalten in den Fischen und dem Wasser. Die zeitliche Differenz bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes erklärt sich möglicherweise in den unterschiedlichen absoluten Fettgehalten der Versuchstiere (Mittelwerte: A = 0,17 g, C = 5,7 g). Offensichtlich wird für die größere Fettmenge eine längere Absättigungszeit benötigt.

Für die Versuchsgruppe B treffen diese Aussagen nicht zu. Die Anreicherung folgt bis etwa 24 Stunden nach Versuchsbeginn dem Kurvenverlauf der Serie A und geht dann in einen stabilen Gleichgewichtszustand über, der jedoch deutlich unter dem der Versuchsgruppen A und C liegt. Die Gründe hierfür dürften in dem extrem schlechten Ernährungszustand dieser Goldorfen zu suchen sein.

Ein direkter Vergleich von Biokonzentrationsfaktoren ist somit nur sinnvoll, wenn die Anreicherungskurven die Steigung Null erreicht haben (steady state) und die Versuchstiere eine ausreichend gute Konstitution aufweisen.

Um aufzuzeigen, welche Berechnungsbasis - Fettgehalt oder Naßgewicht - die bessere Vergleichbarkeit der Biokonzentrationsfaktoren gewährleistet, wurden die mit Lindan durchgeführten Versuche hinsichtlich dieser Fragestellung ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt.

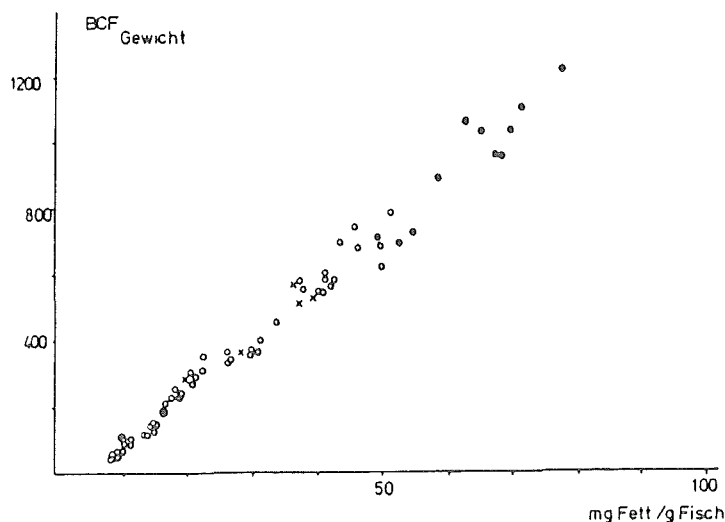


Abb. 5

Abhängigkeit der Biokonzentrationsfaktoren von dem relativen Fettgehalt verschiedener Fischarten

Abb. 5a

Auswertungsbezug BCF Gewicht

- Goldorfen
- Elritzen
- × Karpfen
- Forellen

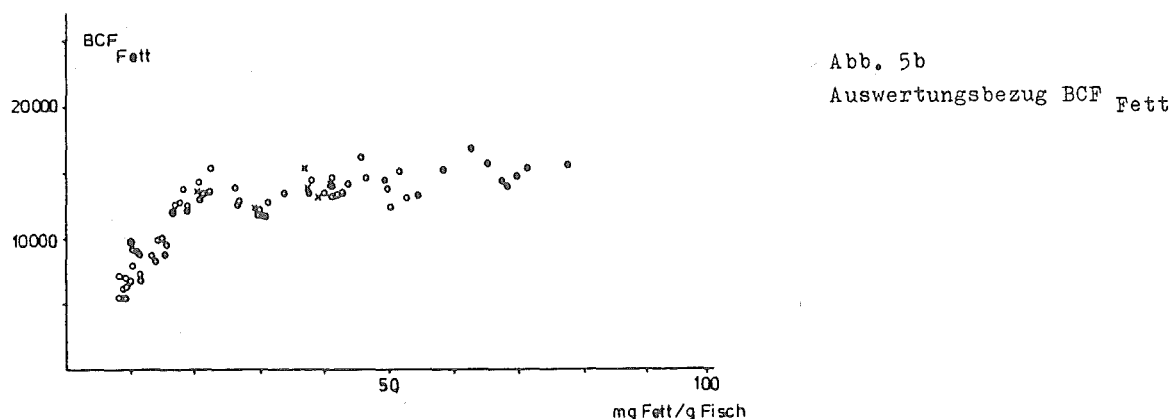


Abb. 5a zeigt, daß im Untersuchungsbereich eine lineare Korrelation zwischen den relativen Fettgehalten der Fische und den naßgewichtsbezogenen Biokonzentrationsfaktoren besteht. Die eigentliche Aufgabe von Biokonzentrationsfaktoren, die direkte Vergleichbarkeit von Ergebnissen zu ermöglichen, wird aufgrund der unterschiedlichen Fettgehalte der Fische stark eingeschränkt.

Dagegen ergibt sich bei fettbezogenen BCF, wenn ein Mindestfettgehalt erreicht ist, unabhängig von der Fischart und dem relativen Fettgehalt der Versuchstiere, ein annähernd gleichbleibender Wert (Abb. 5b). Extrem schlecht ernährte Fische - unter etwa 20 mg Fett / g Fisch - sind daran zu erkennen, daß sie dieses Plateau nicht erreichen. Es erscheint daher vorteilhaft, Biokonzentrationsfaktoren in der in Abb. 5b dargestellten Weise anzugeben, da hierdurch sowohl konzentrations- als auch konditionsbedingte Unterschiede ausgeglichen werden.

Dies sehen wir als eines der wichtigsten Ergebnisse unserer Arbeit an. Zugleich werden damit Hinweise, die es dafür bereits in der Literatur gegeben hatte, bestätigt.

Auf diesen Überlegungen basierend wurde im Folgenden diese Art der Auswertung auch auf die übrigen bearbeiteten Schadstoffe angewandt.

Hexachlorbenzol

Die Akkumulationsversuche mit HCB wurden mit ein- und zweisömmrigen Goldorfen sowie mit einsömmrigen Forellen durchgeführt.

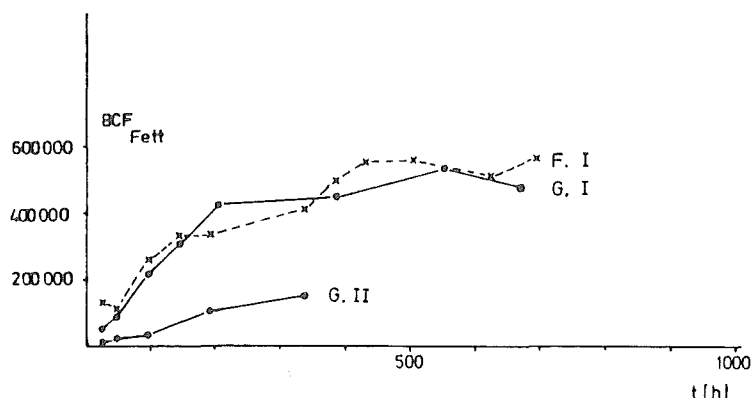


Abb. 6

Anreicherung von HCB in ein- und zweisömmrigen Goldorfen sowie in einsömmrigen Forellen aus dem Wasser

F: Forellen
G: Goldorfen

Im zeitlichen Verlauf der Anreicherung ergaben sich bei den einsömmrigen Fischarten keine Unterschiede.

Der hohe absolute Fettgehalt der älteren Goldorfen bewirkt auch bei HCB, wie aus der Abb. 6 ersichtlich, eine Verlangsamung der Anreicherungsgeschwindigkeit. Ein Plateau wird bei den einsömmrigen Goldorfen und Forellen nach etwa 20 Tagen erreicht. Die Absättigung der zweisömmrigen Fische dauert offenbar erheblich länger. In der Aufnahmekinetik besteht damit grundsätzlich eine Übereinstimmung zwischen HCB und Lindan. Trotz seiner geringen Wasserlöslichkeit von maximal 5 µg/l reichert HCB in erheblich stärkerem Maße an als Lindan. Ausgedrückt als Biokonzentrationsfaktoren ergaben sich Plateauwerte von 550 000 für HCB bzw. 14 000 für Lindan.

Pentachlorphenol

In der Anreicherungskinetik verhält sich dieser Stoff ebenfalls ähnlich wie γ -HCH. Auch in diesem Fall benötigen die Fische mit dem größeren absoluten Fettgehalt einen längeren Zeitraum bis zum Erreichen eines Absättigungsplateaus. Dieses Gleichgewicht war bei einsömmrigen Goldorfen bereits nach etwa 24 Stunden, bei zweisömmrigen nach ca. 240 Stunden erreicht. Der Biokonzentrationsfaktor wurde mit 5110 für einsömmrige bzw. 5370 für zweisömmrige Goldorfen errechnet. Der gleichzeitige Einsatz von γ -HCH und HCB beeinflusste den zeitlichen Verlauf der Anreicherung nicht.

Trichlorbenzol, Trichlorethylen, Dioctylphthalat

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß bei der Herstellung eines Schadstoffkonzentrates für die Durchflußversuche ein Lösungsvermittler, in diesem Fall tertiäres Butanol, verwendet werden mußte. Aus Gründen der zum Teil hohen Flüchtigkeit und um Verluste durch Adsorption möglichst zu vermeiden, wurde das Konzentrat täglich erneuert. Die Zumessung der Stammlösung zum Frischwasser erfolgte mit Hilfe einer Dosierpumpe. Die Versuche mit DOP wurden bei ca. 31 µg/l Wasser, die mit Trichlorethylen und Trichlorbenzol im Mittel bei 68 bzw. 18 µg/l Wasser durchgeführt.

Bei kombiniertem Einsatz von Trichlorethylen, Trichlorbenzol und Lindan war eine Beeinflussung der Anreicherung in Goldorfen durch die Stoffe untereinander nicht nachzuweisen. Durch den Einsatz des Lösungsvermittlers wurde keine Veränderung des Akkumulationsverhaltens von Lindan bewirkt.

Eine zusammenfassende Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Anreicherung aller bearbeiteten Stoffe zeigt die Abb. 7.

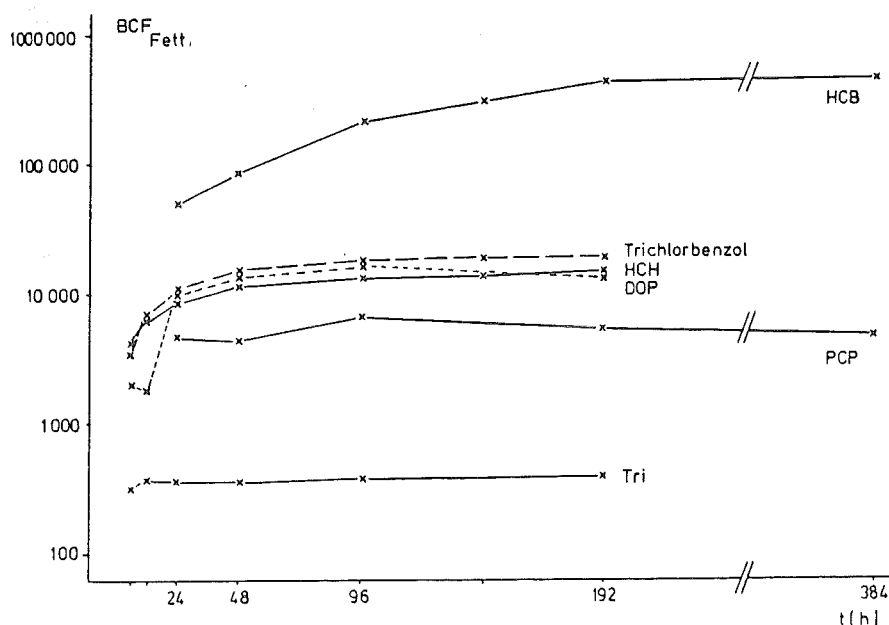


Abb. 7

Zeitlicher Verlauf der Anreicherung verschiedener Schadstoffe aus dem Wasser in Goldorfen

Die deutlichsten Unterschiede in den Anreicherungshöhen ergaben sich für Trichlorethylen und Hexachlorbenzol. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß auch deren Löslichkeiten in Wasser Extremwerte darstellen:

Trichlorethylen: 1 100 000 $\mu\text{g/l}$

Hexachlorbenzol: 5 $\mu\text{g/l}$

Die übrigen untersuchten Stoffe, die sich in ihrer Wasserlöslichkeit nach Angaben der Referenzchemikalienliste zwischen 900 $\mu\text{g/l}$ und 30 000 $\mu\text{g/l}$ bewegen, liegen auch in ihren Anreicherungsplateaus dicht beieinander.

Am wenigsten stimmen DOP und Trichlorbenzol mit der erwarteten Korrelation zwischen den BCF (fettbezogen) bzw. den Verteilungskoeffizienten und der Wasserlöslichkeit überein.

2.3. Anreicherung von Schadstoffen in Fischen über die Nahrung

Eine Schadstoffaufnahme bei Fischen erfolgt im Freiland prinzipiell über das Wasser und über die Nahrung. Langzeitversuche zur peroralen Aufnahme von Lindan, HCB und PCP wurden mit ein- und zweisömmrigen Goldorfen sowie mit Forellen bis zu einem Zeitraum von maximal 51 Tagen durchgeführt. Damit sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob sich der zeitliche Verlauf für die Kontamination sowie das Anreicherungsplateau anders darstellt als bei der Aufnahme aus dem Wasser.

Für HCB ist das Ergebnis in Abb. 8 wiedergegeben.

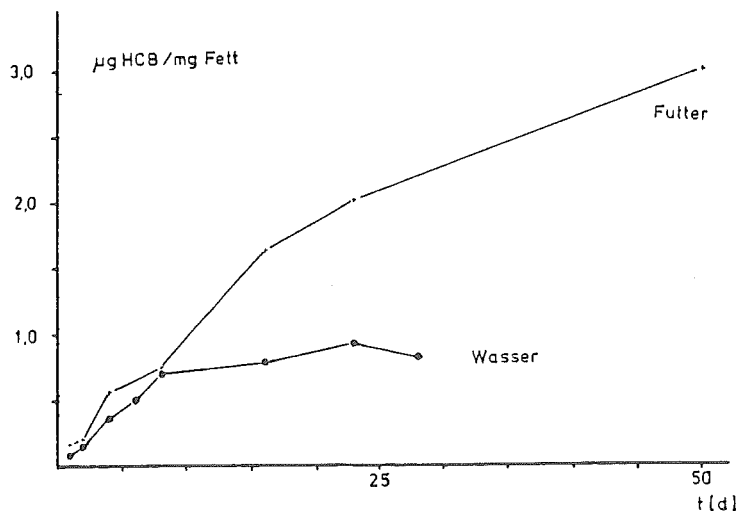


Abb. 8
Vergleichende Darstellung des
Anreicherungsverlaufes von HCB
aus dem Wasser und der Nahrung
bei Goldorfen

Es zeigte sich, daß, anders als bei der Aufnahme aus dem Wasser, auch nach 51 Tagen Fütterungsdauer mit kontaminiertem Futter ein Absättigungsplateau nicht erreicht wurde. Nach dieser Zeit wurde in den Fischen ein HCB-Gehalt von etwa 3 µg pro mg Fett nachgewiesen, ein Wert, der aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit bei Kontaminationsversuchen über das Wasser nie erreicht werden konnte. Trotzdem trat keine Sterblichkeit auf.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei γ-HCH und PCP-haltigem Futter, daß nur eine geringfügige Kumulierung dieser Schadstoffe stattfand. Ein Absättigungsplateau und damit ein Gleichgewicht zwischen der Aufnahme der Stoffe aus dem Futter und der Abgabe an das Wasser wurde offenbar sehr schnell erreicht. Dies veränderte sich mit zunehmender Versuchsdauer trotz kontinuierlicher Zugabe weiterer Schadstoffdosen nicht. Damit schließt sich die Angabe von Anreicherungsraten aus.

Die Durchführung von Fütterungsexperimenten ist wegen der Reinkorporation ausgeschiedenen Schadstoffes im statischen Versuch nicht sinnvoll.

2.4. Versuche mit isoliertem Fischtran

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß die inkorporierte Schadstoffmenge von dem jeweiligen Fettgehalt der Versuchstiere bestimmt wurde. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um ein Verteilungsgleichgewicht der Stoffe zwischen der Fett- und Wasserphase handelt, wurde anstelle von Fischen ein mit Fischtran benetzter Wattebausch in das Durchflußsystem eingebracht. Der Tran verteilt sich als dünner Fettfilm auf den Baumwollfasern und bietet somit eine für die Austauschvorgänge große Oberfläche.

In der Abbildung 9 ist der zeitliche Verlauf der Anlagerung von Trichlorethylen, Trichlorbenzol und Lindan an isolierten Fischtran jeweils im Vergleich zur Anreicherung dieser Stoffe in Goldorfen dargestellt.

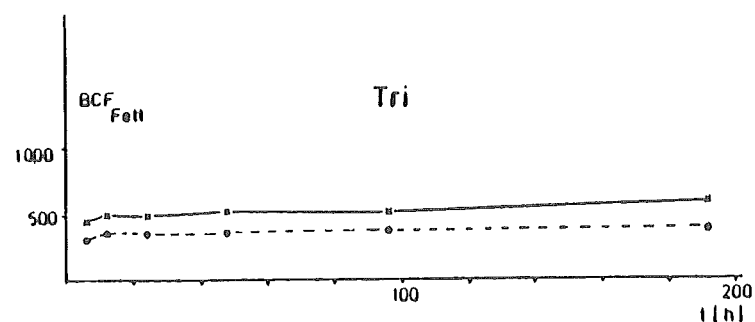
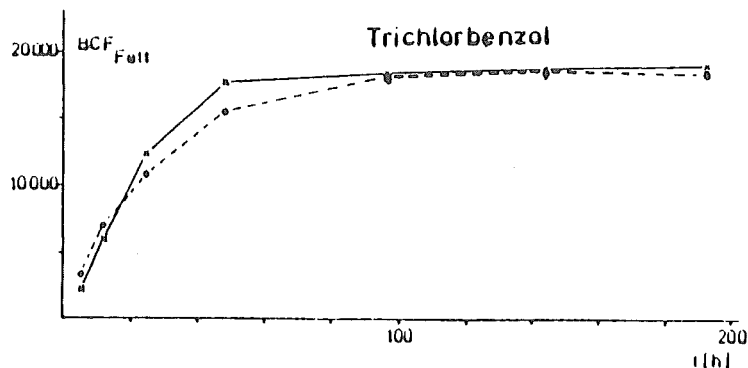
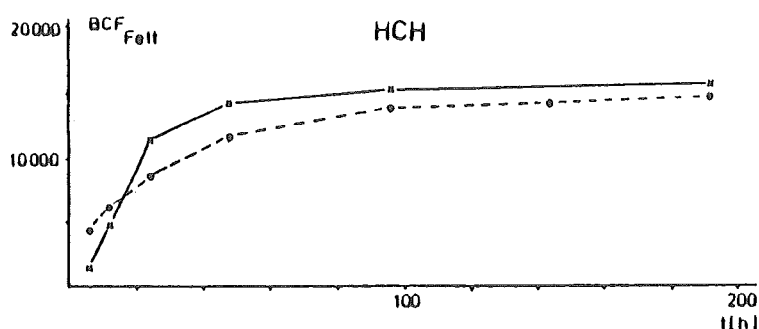


Abb. 9

Anreicherung von Trichlor-
ethylen, Lindan und Trichlor-
benzol in Fischtran im Vergleich
zur Anreicherung in Goldorfen

— Tran
..... Fisch



Es zeigte sich, daß sich die Aufnahmekinetik für Fischtran nicht wesentlich von der lebender Fische unterscheidet. Als Tendenz schien sich jedoch anzudeuten, daß das Anreicherungsplateau für reines Fett insgesamt höher lag. Der als Biokoncentrationsfaktor ausgedrückte steady-state-Zustand ist als Verteilungsgleichgewicht zwischen Fett- und Wasserphase anzusehen.

2.5. Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser

Zur Darstellung der Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Phasen wird häufig der Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser angegeben, wobei Oktanol stellvertretend für organische Gewebe steht.

In den letzten Jahren sind Berechnungsmodelle entwickelt worden, nach denen mit Hilfe der Wasserlöslichkeit und dieses Verteilungskoeffizienten Biokonzentrationsfaktoren ohne experimentelle Untersuchungen abgeschätzt werden können. Die eigenen Ergebnisse sind im tabellarischen Anhang zusammen mit den entsprechenden Daten, ermittelt aus verschiedenen Berechnungsarten, aufgeführt. Bei dem Bezug der Biokonzentrationsfaktoren auf das Fettgewicht zeigt sich größenordnungsmäßig eine zum Teil gute Übereinstimmung mit den zugehörigen Verteilungskoeffizienten. Das gleiche gilt entsprechend für die auf das Naßgewicht der Fische bezogenen BCF-Werte. Der Nachteil solcher Verfahren besteht darin, daß weder die Zeitabhängigkeit der Bioakkumulation über Wasser oder Futter, noch die Eliminationsdauer und die biologische Halbwertszeit erfaßt werden.

Insgesamt gesehen scheint die Möglichkeit zu bestehen, Anreicherungsraten lipophiler Schadstoffe zu ermitteln, ohne daß die Verwendung lebender Versuchsorganismen notwendig ist. Bei einem Test mit Fischtran sind jedoch weitere Untersuchungsreihen mit unterschiedlicher Methodik erforderlich.

2.6. Anreicherung von Schadstoffen in Organen

Um die Verteilung von HCB, Lindan und PCP innerhalb des Fischkörpers zu quantifizieren, wurden die Organe Kiemen, Gehirn, Leber, Magen-Darm-Trakt und Filet nach der Kontamination sowohl über das Wasser als auch über die Nahrung untersucht.

Die Experimente wurden wegen der höheren Organgewichte mit zweisömmrigen Goldorfen durchgeführt.

Von den untersuchten Organen wurden für die Abbildung 10 Gehirn und Leber ausgewählt, da nur hier spezifische Unterschiede zum Schadstoffgehalt des gesamten Fisches feststellbar waren.

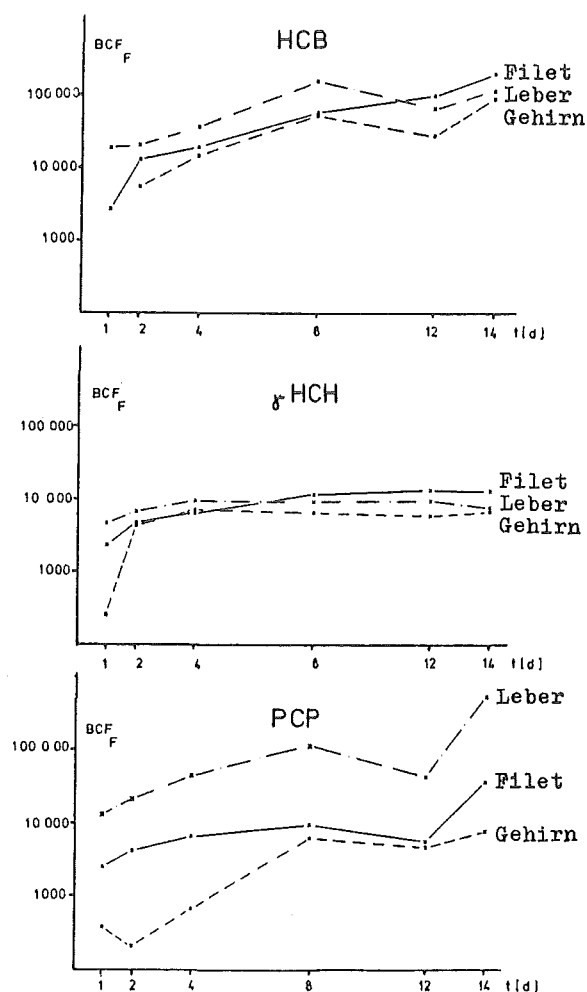


Abb. 10

Vergleichende Darstellung des Anreicherungsverlaufes von HCB, γ -HCH und PCP aus dem Wasser in Leber, Gehirn und Filet bei zweisömmerigen Goldorfen

Bei der Verwendung von HCB lagen die im Gehirn nachgewiesenen Werte generell unter denen der übrigen Organe. Dies trifft auch für Lindan nach Kontamination über das Wasser zu. Für PCP ergab sich sowohl bei der Kontamination über das Wasser als auch über die Nahrung ein deutlich erhöhter Schadstoffgehalt der Leber, der nicht mit deren Fettgehalt korrelierbar war.

2.7. Untersuchungen zur Elimination der Schadstoffe

Die Versuchsfische wurden unterschiedlich lange jeweils über das Wasser oder die Nahrung vorkontaminiert und nach Ablauf dieser Phase in einen Frischwasserdurchfluß umgesetzt. Sie hatten nach dieser Zeit, je nach Art und Dauer der Kontamination, unterschiedliche Schadstoffgehalte erreicht, die jeweils

den Basiswert für die Dekontamination darstellten. Folgende Halbwertszeiten wurden für die verwendeten Schadstoffe ermittelt:

Trichlorethylen : 6 Stunden
Pentachlorphenol : 13 bis 16 Stunden
Dioctylphthalat : 28 Stunden
Trichlorbenzol : 33 Stunden

Überraschenderweise ergaben sich jeweils für Hexachlorbenzol und Lindan stärkere Schwankungen für die Halbwertszeiten:

Lindan : 11 bis 70 Stunden
Hexachlorbenzol : 55 bis 194 Stunden

Eine Beziehung zur Dauer der Vorkontamination konnte ebenso wenig hergestellt werden wie eine Korrelation mit der Höhe des Basiswertes. Wahrscheinlicher ist vielmehr, daß die jeweilige Eliminationsgeschwindigkeit von dem Fettgehalt der Versuchstiere abhängig ist. Dies ist in der folgenden Abbildung für Lindan und HCB dargestellt.

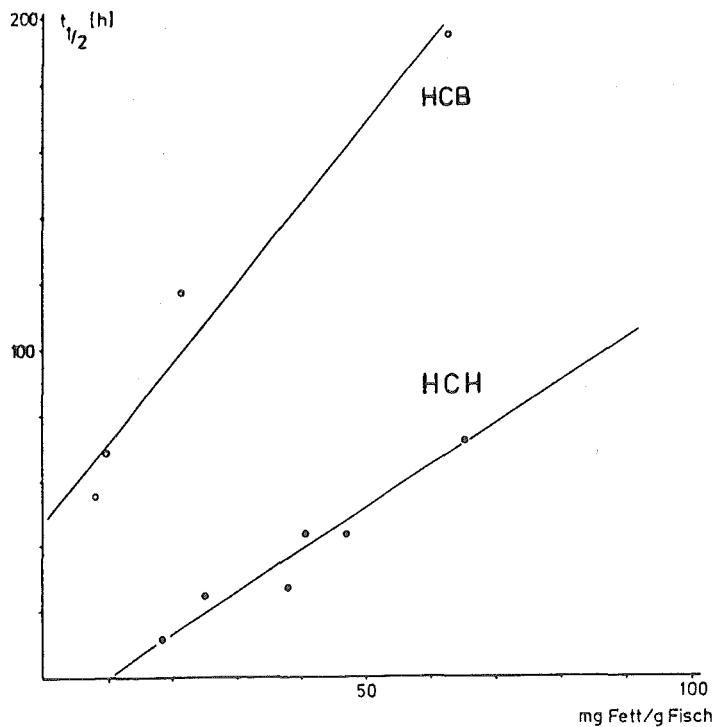


Abb. 11
Abhängigkeit der biologischen
Halbwertszeit von dem relativen
Fettgehalt der Versuchsfische

Bei der Verwendung von reinem Fischtran ergaben sich bei der Dekontamination Werte, die sich mit den oben angegebenen vergleichen lassen:

Trichlorethylen : 9 Stunden
Trichlorbenzol : 50 Stunden
Lindan : 58 Stunden

Die Art der Schadstoffaufnahme - über das Wasser oder das Futter - ist offenbar ohne Einfluß auf die Eliminationsgeschwindigkeit, da sich entsprechende Werte auch in Fütterungsversuchen ergaben.

Vergleich experimentell gefundener Daten mit solchen aus Berechnungsmodellen

Schadstoff	Berechnete Verteilungskoeffizienten nach:		K _{OW} aus Referenzchem.-Liste	Experimentelle Daten		Berechnete Biokonzentrationsfaktoren nach:			
	CHIOU	KENAGA		BCF _{Pett}	BCF _{Gewicht}	CHIOU	NEELY	KENAGA aus K _{OW}	aus WS
γ-HCH	11046 (4,04)	2782 (3,44)	5248 [*] (3,72)	14100 (4,15)	589 (2,77)	519 (2,72)	138 [*] (2,14)	96 [*] (1,98)	194 (2,29)
HCB	1460495 (6,16)	997700 (6,00)	1513561 (6,18)	550000 (5,74)	8200 (3,91)	2624 (3,42)	2976 (3,48)	19200 (4,28)	12267 (4,09)
DOP	57148 (4,76)	15667 (4,20)	9500 (3,98)	16500 (4,22)	775 (2,89)	1683 (3,23)	191 (2,28)	168 (2,23)	656 (2,82)
PCP	7030 (3,05)	1742 (3,24)	102329 (5,01)	5240 (3,72)	401 (2,60)	344 (2,54)	690 (2,84)	1545 (3,19)	140 (2,15)
TRICHLOR-ETHYLEN	236 (2,37)	53 (1,73)	195 (2,29)	373 (2,37)	18 (1,26)	26 (1,42)	23 (1,37)	4 (0,65)	12 (1,08)
TRICHLOR-BENZOL	3270 (3,51)	947 (2,98)	1500 (3,18)	18320 (4,76)	914 (2,96)	192 (2,28)	70 (1,85)	30 (1,48)	91 (1,96)

* K_{OW} nach KURIHARA

Berechnungsgrundlagen

nach CHIOU:

$$\log K_{OW} = 5,00 - 0,670 \log S \text{ (}\mu\text{mol/l)}$$

$$\log BCF = 3,41 - 0,508 \log S \text{ (}\mu\text{mol/l)}$$

nach NEELY:

$$\log BCF = 0,542 \log K_{OW} + 0,124$$

nach KENAGA:

$$\log K_{OW} = 4,158 - 0,800 \log S \text{ (ppm)}$$

$$\log BCF = -1,495 + 0,935 \log K_{OW}$$

$$\log BCF = 2,791 - 0,564 \log S \text{ (ppm)}$$

S = Wasserlöslichkeit

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (037 202)

Akute und chronische Effekte von ausgewählten Substanzen der "Schwarzen Liste" der EWG auf repräsentative Binnengewässertiere. - Auswirkung auf Webaktivität und Netzbau von Hydropsyche.

Schreiber, Irmela und Besch, W.K.

Landesanstalt für Umweltschutz

Baden-Württemberg

Institut für Wasser- und Abfallwirtschaft

7500 Karlsruhe 21, Griesbachstr. 3

Institutsleiter

Direktor Dipl.-Ing. Pippart

Dezember 1981

Zusammenfassung

Die Bereitschaft von Hydropsyche-Larven, Netze zu weben, wurde durch 24 und 48 Stunden-Behandlung mit 100 und 200 mg Trichloräthylen beeinträchtigt. 24 Stunden-Behandlung gefolgt von einer 24-stündigen Erholung führte zu einer Stimulation der Webaktivität und zu einer Verbesserung der Netzqualität. 500 μg Hg/l (als HgCl_2) und 5 mg Phenol/l reduzierten die Anzahl der netzbaubereiten Larven. Die Schwellenkonzentration von HgCl_2 konnte um mehr als 50 % durch Verwendung derselben Individuen als eigene Kontrolle gesenkt werden. Durch Phenolexposition - 50 und 100 mg/l - verloren einigen Larven ihre Fähigkeit, die Netze in der Strömung zu orientieren. Der Hydropsyche-Netzwebtest ist zwar sehr aufschlußreich, aber zugleich auch sehr zeitaufwendig.

Summary

The readiness of Hydropsyche larvae to weave catching nets was lowered by 24 and 48 hs exposure to 100 and 200 mg Trichlorethylen. 24 hs treatment with the same substance followed by 24 hs recovery led to a stimulation of weaving and improved net quality. 500 μg Hg/l (as HgCl_2) and 5 mg Phenol/l reduced the numbers of net spinning larvae. Using the same individuals as their own controls by comparing pre- and posttreatment nets the threshold concentration of HgCl_2 could be lowered by more than 50 %. After exposure to 50 and 100 mg Phenol/l some larvae lost their capacity to orientate their catching nets in respect to the water current. The Hydropsyche net weaving test is very informative lent at the same time very time consuming.

Akute und chronische Effekte von ausgewählten Substanzen
der "Schwarzen Liste" der EWG auf repräsentative Binnen-
gewässertiere. - Auswirkung auf Webaktivität und Netzbau
von Hydropsyche (Trichoptera, Insecta)

Schreiber, I. und Besch, W. K.

1. Einleitung und Methoden

Die Versuche (Beginn jeweils spätestens 24 Stunden nach
Aufsammlung im Freiland) waren statisch. Es wurden Trichlor-
äthylen, Quecksilberchlorid und Orthophenol getestet. Die
Versuchstiere - Larven von Hydropsyche angustipennis aus
der Kinzig bei Ortenberg/Baden - wurden einer ständigen
Strömung von etwa 5 cm/sec ausgesetzt. Sie befanden sich
zum Netzweben in künstlichen Schlupfwinkeln ("Logettes"
nach der Nomenklatur von DECAMPS et alii, 1973) mit zur
Strömung parallelen Wänden. Nach Abschluß des Versuches
wurden die Tiere aus den Logettes vertrieben und die Spinn-
produkte in getrocknetem Zustand untersucht. Es wurden fol-
gende Effekte durch Zählung oder Messung ermittelt: Anzahl
der Larven, die nur Wohnbauten fertigten, Anzahl derer,
die auch deutlich strukturierte bzw. unregelmäßige, nicht
qualitativ auswertbare Freßnetze webten. Hier wurden folgen-
de Eigenschaften berücksichtigt: Maschenzahl, Symmetrie,
Winkelbildung zwischen Kette- und Schuß-Fäden, ferner die
Zahl von Webfehlern wie Fadenüberkreuzungen und Fadenunter-
brechungen.

Weitere Einzelheiten des Versuchsaufbaus können aus BESCH
et al (1977) und (1979) entnommen werden. Erstmalig wird
hier auch der Netzbau derselben Individuen vor und nach
der Giftexposition untersucht. Die Analysen der Netzstruk-
tur gründen sich auf die Studien des Netzbaues durch
SATTLER (1958).

2. Ergebnisse

2.1 Trichloräthylen

Von 100 und 200 mg/l wurden nach einer Stunde noch rund 50 %, nach zwei Stunden 20 % und nach sechs Stunden nur noch 1 % wiedergefunden. Ausgangskonzentrationen unter 100 mg/l blieben, wie Vorversuche zeigten, ohne Auswirkung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abbildung 1 zusammengefaßt

Tri (mg/l)	Exposi- tion (Std.)	Zahl der Tiere	Aktive Tiere		
			A	B	C
0	24	62	2	37	33
	48	62	3	30	27
100	24	62	7	23	15
	48	47	2	17	5
	48	20	2	4	8
200	24	42	1	15	4
	48	27	1	7	1
	48	22	3	6	4

Tabelle 1: Ergebnisse der Versuche mit Trichloräthylen

Für jede Ausgangskonzentration Expositionszeiten und Behandlungen in der Reihenfolge: nach 24 Std., nach 48 Std. Wasserwechsel und Neudosierung nach 24 Stunden, nach 48 Stunden ohne Wasserwechsel und ohne Neudosierung. Anzahl der aktiven Tiere: A) nur Wohngespinnst, B) unregelmäßiges, nicht auswertbares Freßnetz, C) auswertbares Netz.

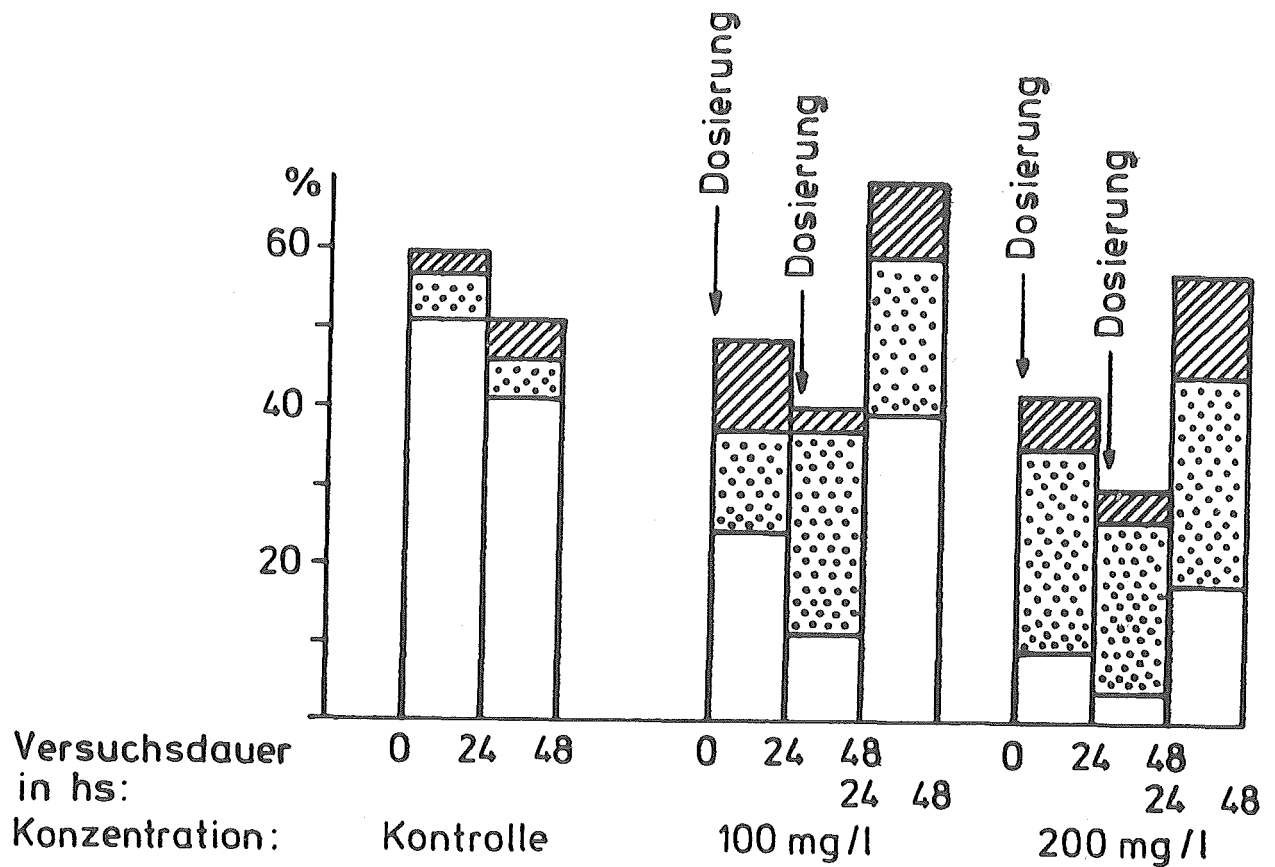


Abbildung 1: Spinnaktivität von Hydropsyche unter Trichloräthylen-Einfluß.

Gesamtsäulenhöhe = Gesamtspinnaktivität
 Gepunktet = nicht auswertbare Netze
 Heller Teil = auswertbare Netze
 Schraffiert = nur Wohngespinnst
 Pfeile markieren Trichloräthylendosierung

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1) Die Spinnaktivität nimmt unter gleichbleibenden Bedingungen (also auch in den Kontrollen) am 2. Tag ab.
- 2) Die Gesamtspinnaktivität ist bei Tri-Zugabe ab 100mg/l verringert. (Für 24 Std. : $p < 5\%$).
- 3) Der Freßnetzbau ist bei Tri-Zugabe verringert. (Signifikanz wie bei der Spinnaktivität)

- 4) Die Zahl der qualitativ auswertbaren Netze ist bei Tri-Zugabe signifikant ($p < 5 \%$) geringer.
- 5) 200 mg/l bewirken jeweils eine geringere Zahl an auswertbaren Netzen als 100 mg/l ($p < 5\%$).
- 6) Die Schädigungen von 100 mg/l sind bei einmaliger Dosierung reversibel.

Wenn man aber die Gesamtwebaktivität unter Kontrollbedingungen nach 48 Stunden (ohne Wasserwechsel) zum Vergleich heranzieht, kann man von Stimulation sprechen. Auffällig hoch bleibt nach einmaliger, 100 wie 200 mg/l-Behandlung, der Anteil der nicht auswertbaren, weil zu unregelmäßigen Freßnetze. Bemerkenswert ist aber andererseits das Ausmaß der Regelmäßigkeit und der Maschenreichtum der verbleibenden auswertbaren Netze, die nach 24-stündiger 200 mg/l-Behandlung entstanden.

2.2 Quecksilberchlorid

Die Analysen wurden mit dem Kaltdampfverfahren nach Hach und Ott (Hg-Dampfmonitor der Firma Kipp-Analytica) durchgeführt. Die nominalen und tatsächlichen im Versuchsablauf gefundenen Konzentrationen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

nominal ug/l	0 Std.	2 Std.	6 Std.	24 Std.
0	0,10	0,23	0,78	0,21
100	38	32	35	25
200	142	74	51	83
500	542	150	174	118

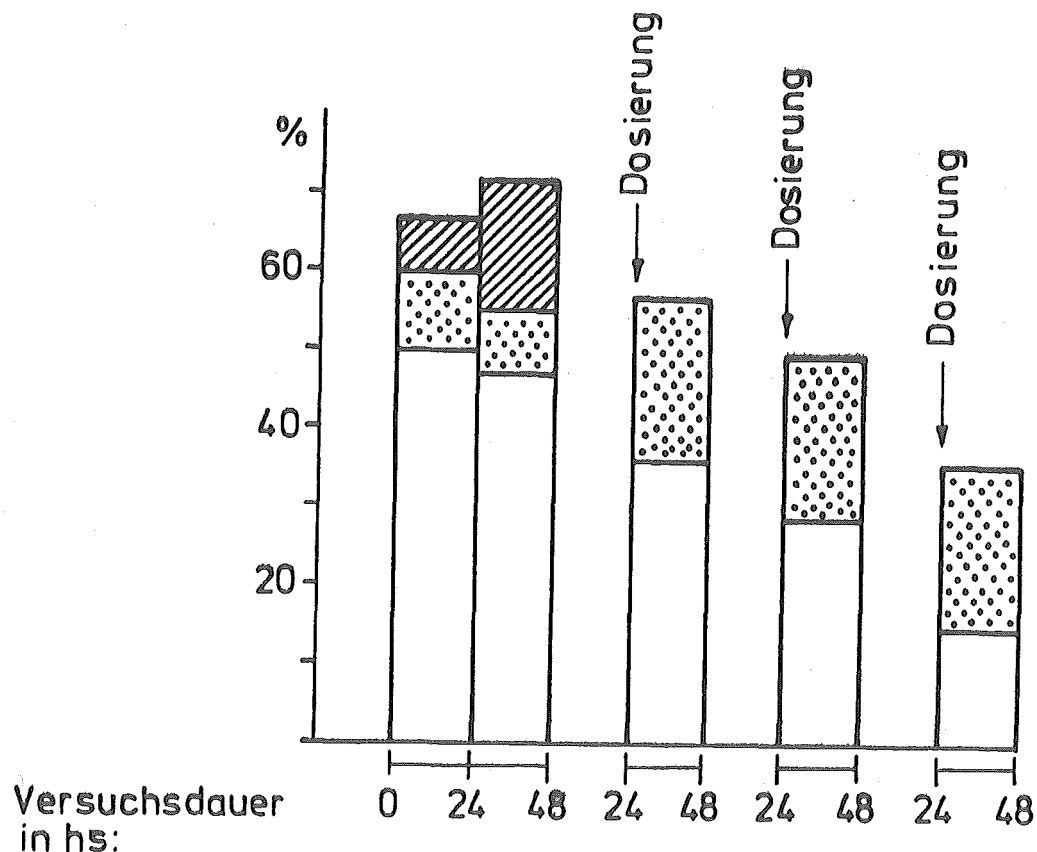
Tabelle 2: Nominale und tatsächlich gemessene Hg-Konzentrationen

Die Testergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 2 zusammengestellt.

Hg ($\mu\text{g/l}$)	Exposi- tion (Std.)	Zahl der Tiere	Aktive Tiere		
			A	B	C
Kontr.	24	30	2	18	15
Kontr.	48	36	6	20	17
100	24	14	0	8	5
200	24	14	0	7	4
500	24	14	0	5	2

Tabelle 3: Versuche mit Quecksilberchlorid

Am ersten Versuchstag waren alle Tiere unter Kontrollbedingungen. Danach erfolgten die 24-stündigen HgCl_2 -behandlungen. Im übrigen wird auf die Legende der Tabelle 1 verwiesen.



Konzentration: Kontrolle 100mg/l 200mg/l 500mg/l

Abbildung 2: Anteil von webenden *Hydropsyche* unter Einfluß von HgCl_2
Weitere Erläuterungen vgl. Abb. 1

Bei den Daten von Tabelle 3 sind die Individualnetze wie auch die "anonymen" Netze berücksichtigt.

Die aus Abb. 2 ersichtlichen Effekte sind:

- 1) Abnahme der Gesamtspinnaktivität (nur für Kontrolle/ 500 $\mu\text{g/l}$ signifikant, ($p < 5 \%$)
- 2) Abnahme des Freßnetzbaues mit steigender Konzentration (nicht signifikant)
- 3) Abnahme der Auswertbarkeit der Freßnetze mit steigender Konzentration (nur für Kontrolle / 500 $\mu\text{g/l}$ signifikant, $p < 5 \%$)

(Der Bau eines Netzes, ob mit regelmäßiger oder nicht erkennbarer Struktur, bedeutet auch Bau eines Wohngespinstes. Somit stellt in Abb. 2 der schraffierte Anteil - "nur Wohngespinnste" - nicht wie es den Anschein hat das empfindlichste Merkmal dar)

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
B	0	0	0	0	100	100	100	100	200	200	200	200	500	500
C	144	60	120	140	115	144	170	40	150	90	90	= ¹⁾	132	125
D	132	100	40	145	80	23	168	90	130	140	132	= ¹⁾	56	28
E	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	o ¹⁾	-	-

Tabelle 4: Unterschiede des Netzbaues derselben Exemplare vor und nach Behandlung mit Quecksilber.

A: Nummerierung des Testtieres

B: Nominale Konzentration

C: Maschenzahl unter Kontrollbedingungen

D: Indices der Qualitätsveränderung + = Verbesserung,
- = Verschlechterung, 0 = Veränderung ¹⁾ Netzstruktur nicht auswertbar.

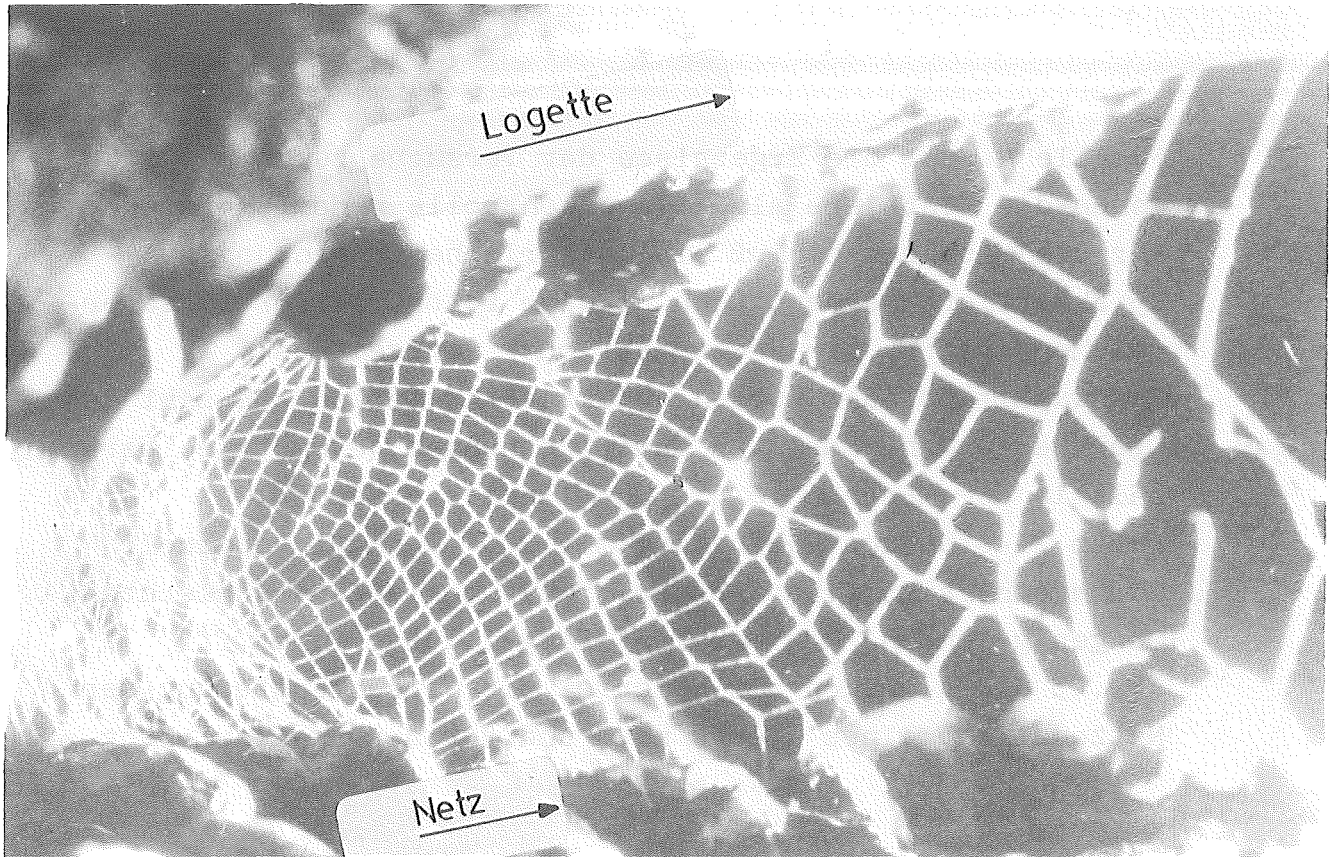


Abbildung 3: Unter Kontrollbedingungen nach 24 Stunden gewebtes Netz.

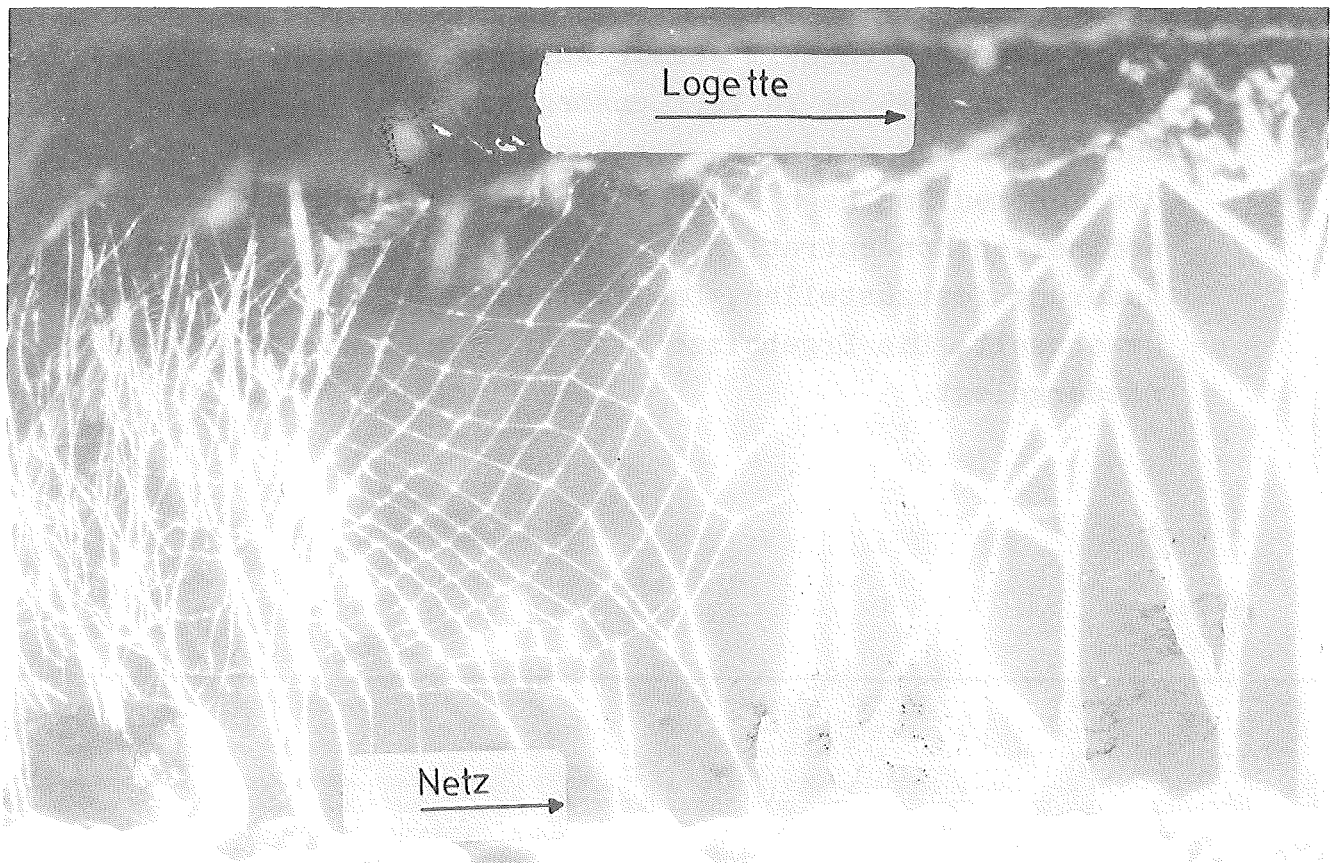


Abbildung 4: Ein Netz desselben Tieres wie in Abb. 3 nach Behandlung mit 500 $\mu\text{g/l}$ Hg (24 hs). Es ist stark verkleinert und noch wichtiger: stark dissymmetrisch.

Tabelle 4 faßt die Ergebnisse der Versuche zusammen, in denen die Testtiere als eigene Kontrolle genommen wurden. Für die Maschenzahl muß eine natürliche Schwankung von ± 15 akzeptiert werden. Denn, um eine solche Differenz zu erreichen, reicht ein Faden mehr oder weniger aus. Zum Qualitätsindex wurden objektive Kriterien wie Zahl der Überkreuzungen, Zahl von Unterbrechungen, Symmetrie (Verhältnis der Maschen rechts und links) verwandt. Durch 24-stündige Behandlung mit 200 $\mu\text{g Hg/l}$ (nominell) wurde eine signifikant höhere Zahl von Indexverschlechterungen gefunden (McNemar Test, Siegel 1959, S. 63 ff). Abb. 3 und 4 zeigen als Beispiel die Verschlechterung der Netzqualität eines Tieres nach und vor der Hg-Einwirkung.

2.3 Orthophenol

Die Konzentrationen im Wasser wurden direkt photometrisch bei 270 und 275 nm zu Versuchsbeginn, nach einer, vier und 24 Stunden gemessen. Die Abnahme war bis zum Wechsel des Testmediums nach 24 Stunden nur gering, bei einer nominellen Konzentration von 100 mg/l war überhaupt keine Änderung festzustellen. Das Testmedium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und Abbildung 5 niedergelegt.

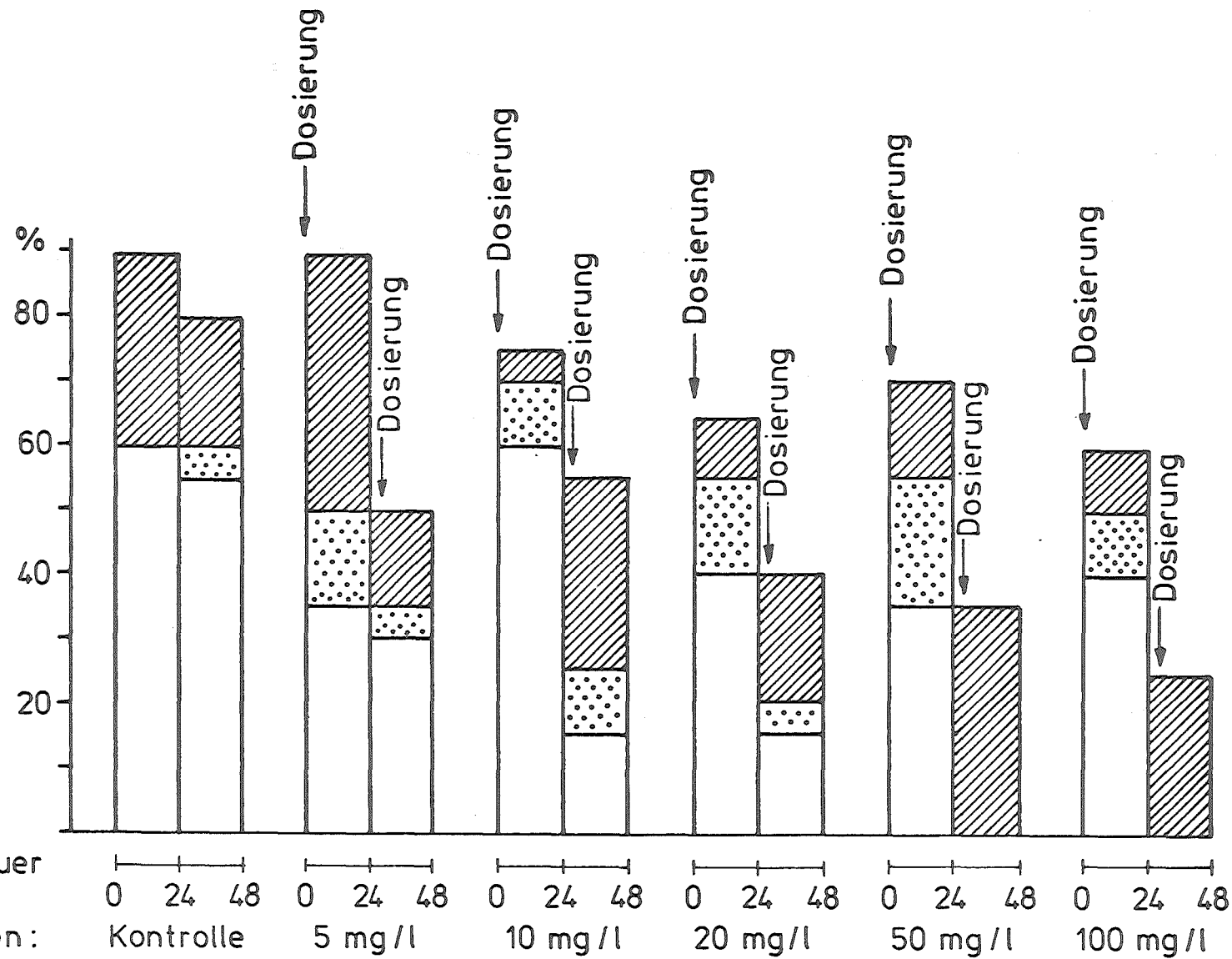


Abbildung 5: Siehe Erläuterungen zu Abb. 1 und Text S. 9

Phenol (mg/l)	Exposi- tion (Std.)	Zahl d. Tiere	Aktive Tiere		
			A	B	C
Kontr.	24	20	6	12	12
	48	20	4	12	11
5	24	20	8	10	7
	48	20	3	7	6
10	24	20	1	14	12
	48	20	6	5	3
20	24	20	2	11	8
	48	20	4	4	3
50	24	20	3	11	7
	48	20	7	0	0
101	24	20	2	10	8
	48	20	5	0	0

Tabelle 5: Ergebnisse der Versuche mit Phenol,
weitere Erläuterungen siehe Tabelle 1

Die aus Abbildung 5 ersichtlichen Effekte sind:

- 1) Gesamtspinnaktivität ist der einzige Parameter, der während der ersten 24 Stunden beim Vergleich von Kontrolle/100 mg/l signifikante ($p < 5 \%$) Unterschiede aufzeigt. Alle anderen Parameter (Freßnetzbau, auswertbare Netze) und die niedrigeren Konzentrationen führen zu keinen signifikanten Ergebnissen bei der 24-Stunden-Exposition.
- 2) Bei den 48-Stunden-Expositionen treten dagegen signifikante Unterschiede auf bei der Gesamtspinnaktivität ($p < 5 \%$), beim Freßnetzbau ($p < 1 \%$) und bei den auswertbaren Netzen ($p < 1 \%$) bereits ab 5 mg Phenol/l.

- 3) Die Webaktivität nimmt auch unter Kontrollbedingungen nach 48 hs Versuchszeit gegenüber nur 24 Stunden ab. Dies ist aber nach Phenolzugabe viel ausgeprägter.
- 4) Im gewählten Konzentrationsbereich sind Effekte also erst nach längerer Expositionszeit zu erkennen. Bei den höchsten Konzentrationen (50 und 100 mg/l) sind die Tiere am zweiten Tag überhaupt nicht mehr in der Lage, irgendwelche Netze zu spinnen.

Eine Analyse der Netze ließ ebenso wenig wie bei Trichloräthylen und Quecksilberchlorid keine spezifischen Unregelmäßigkeiten oder Anomalien der Netzstruktur erkennen.

Auffallend war jedoch, daß sowohl bei 50 wie bei 100 mg/l jeweils ein Netz mit der Strömung orientiert war und nicht - wie üblich - gegen die Strömung. Dieses bisher noch nie beobachtete und anscheinend nur für Phenol typische Phänomen läßt vermuten, daß der Orientierungssinn gestört wird. Bei einigen phenolbehandelten Tieren fehlten die mediane Abknickung der Fäden, die sie bei "Symmetrieachse" der Netze bilden. Die Fäden stoßen hier wie bei einem herkömmlichen Gewebe im rechten Winkel aufeinander. Eine Netzseite ist hier ausgefallen. Auch diese Vereinfachung könnte eine Folge des bereits erwähnten Verlustes der Orientierung in der Strömung sein. Auf die gleiche Ursache weist hin, daß weitere Netze behandelter Larven gefunden wurden, die in mehr oder weniger großem Winkel zur Strömung orientiert waren (Abb. 6). Sonst sind Netz und Logette stets parallel orientiert (Abb. 3 und 4).

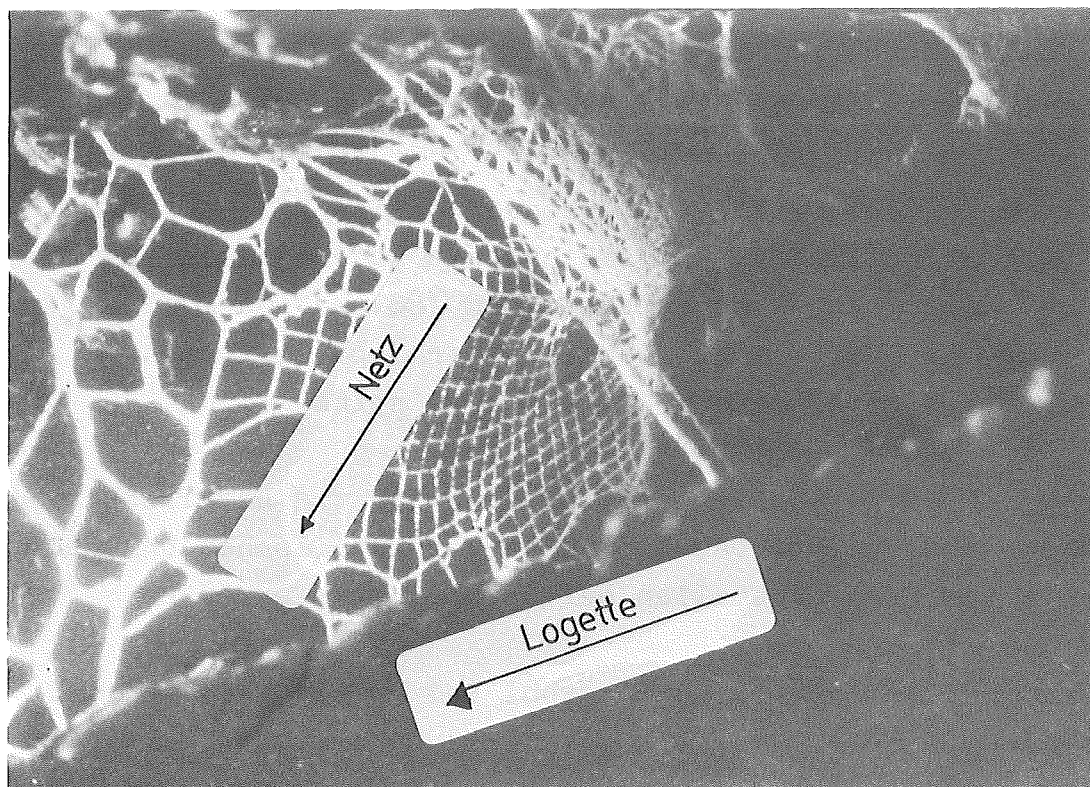


Abbildung 6: Besonders deutliche Schrägorientierung
eines Netzes in der Logette,
20 mg Phenol/l, 24 hs

3. Wertung des Hydropsychetestes

Beim Hydropsychetest handelt es sich um einen sublethalen Test, d. h. man kann anhand der Verhaltensänderung beim Netzbau auf einen für das Tier schädlichen Wasserinhaltsstoff schließen, bevor dieser tödlich wirkt. Die drei in diesem Rahmen getesteten Gifte erwiesen sich auch in hohen Konzentrationen als nicht besonders toxisch, d. h. Hydro-psyche-Larven sind relativ unempfindlich. (Quantitative Effekte ab 100 mg Tri/l, 500 μ g Hg/l und 50 mg Phenol/l!)

Der Versuchsaufbau ist weder teuer noch platzaufwendig. Bei kurzer Expositionszeit (1 bzw. 2 Tage) können größere Mengen von Tieren gleichzeitig im gleichen System getestet werden. Allerdings können die Außenbedingungen (z. B. Wasserinhaltsstoffe, Wasserströmung und Logettebeschaffenheit) nur bedingt standardisiert werden.

Ein Nachteil ist, daß zur Zeit noch die Tiere zu jedem Versuch aus dem Freiland geholt werden müssen, d. h. man ist von einem sicheren Fundort und den Abflußverhältnissen (Zugänglichkeit) abhängig. Allerdings dürfte es grundsätzlich möglich sein, Larven aus im Freiland gesammelten Gelegen großzuziehen.

Die möglichen Parameter, eine Schädigung festzustellen, sind zahlreich. Die quantitativen Kriterien (Gesamtspinnaktivität, Netzbauaktivität und Zahl der auswertbaren Netze) führten in jedem Falle zu eindeutigen Aussagen, sie können also als Schädigungsmaß gelten. Als neuer Parameter wird der Winkel zwischen der Längsrichtung der Logette und der des Netzes eingeführt. Um Veränderungen in der Netzstruktur zu erkennen und diese zu deuten, ist zwar eine eingearbeitete Kraft erforderlich, dafür aber sind nicht nur einfache quantitative, sondern auch interessante aufschlußreiche und qualitative Veränderungen bisweilen festzustellen.

Nach den bisherigen Erfahrungen eignet sich der Test besonders gut für neurotrope Substanzen.

Der gesamte Arbeitsaufwand (Besorgen der Larven, Exposition, Photographie der Netze und Auswertung) ist aber sehr groß, d. h. er beläuft sich mit Auswertung auf bis zu drei Wochen. Als Routinetest ist dieses Verfahren also nicht geeignet. Die zu erfüllende Mindestanforderung ist die Aufzucht von Larven in größeren Mengen aus Gelegen im Labor.

Literatur

- Besch, W. K., Schreiber, I., Herbst, D.: Der Hydropsychetest, erprobt an Fenethcarb - Schweiz.Z.Hydrol. 39, 69-79 (1977)
- Besch, W. K., Schreiber, I., Magnin, E.: Influence du Sulfate de Cuivre sur la structure du filet des Larves d'Hydropsyché (Insecta, Trichoptera) - Annales de Limnologie 15 (2), 123- 138 (1979)
- Décamps, H., Besch, W. K. et Vobis, H.: Influence de produits toxiques sur la construction du filet des larves d'Hydropsyché (Insecta, Trichoptera) - C. R. Acad.Sc. Paris, 276 D, 375 - 378 (1973)
- Sattler, W.: Beiträge zur Kenntnis von Lebensweise und Körperbau der Larve und Puppe von Hydropsyché Pict. (Trichoptera) mit besonderer Berücksichtigung des Netzbaues - Z.Morph.ökol.Tiere 47, 115 - 192 (1958)
- Siegel, S.: Nonparametric Statistics for the Behavioural Sciences McGraw-Hill, New York, 312 pp (1959)

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (O3 7219)

Untersuchungen zum Sorptions- und Remobilisierungs-
verhalten von Chemikalien in künstlichen und natür-
lichen Sedimenten - Auswirkungen auf das System Se-
diment/Tubificidae

Dipl.Biol. J. Bibo

und

Prof. Dr. G. Müller

Institut für Sedimentforschung der Universität
Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 236, 6900 Hei-
delberg

Institutsleiter: Prof. Dr. German Müller

April 1982

Zusammenfassung

Die Beurteilung und Risikoabschätzung einer Umweltchemikalie ist ohne Wissen über ihr Expositionspotential nicht möglich. Im Rahmen dieses Untersuchungsprogramms sollte das Geo- und Bioakkumulationsverhalten von Benzo(a)pyren bestimmt werden, um Voraussagen über entsprechende Expositionskonzentrationen treffen zu können.

Das Geoakkumulationsverhalten wurde mittels Adsorptions- und Desorptionsversuchen an verschiedenen Tonmineralien und natürlichen Sedimenten untersucht. Die ermittelten Adsorptionsdaten ließen sich gut mit Freundlich-Adsorptionsisothermen beschreiben. Die K_f -Werte lagen zwischen 209 (für Quarz) und 1170 (Sediment aus einer Tongrube bei Wiesloch). Eine Abhängigkeit der Adsorptions- und Desorptionsisothermen von Sedimentparametern konnte nicht signifikant bewiesen werden. In erster Linie unterliegen die Adsorptionsprozesse einem durch Lösungsvorgänge bedingten Entropieeffekt, welches das sogenannte "hydrophobic bonding" zur Folge hat.

In Bioakkumulationsversuchen wurde der Transfer von Benzo(a)pyren aus belastetem Sediment in sedimentbewohnende Organismen (Tubificiden) untersucht. Die hierbei aufgetretenen Transferfaktoren lagen im allgemeinen bei ~ 1 . Beeinflusst wurde die Akkumulation von Benzo(a)pyren in Tubificiden im wesentlichen durch die Versuchstemperatur und die Art des Sediments. Die Aufnahmeprozesse können durch die Benzo(a)pyren-Konzentrationen im Porenwasser nicht hinreichend erklärt werden, wahrscheinlich spielen Mobilisationsprozesse aus dem Sediment während der Darmpassage eine noch nicht geklärte Rolle.

Abstract

The evaluation and risk assessment of an environmental chemical is not possible without knowledge of its availability potential. Within the framework of the present experimental series it was attempted to determine the geo- and bioaccumulation behaviour of Benzo(a)pyrene in order to estimate the corresponding rates of concentration.

The geoaccumulation behaviour was investigated in adsorption and desorption experiments on various clay minerals and natural sediments. Adsorption data gained are well described by Freundlich adsorption isotherms. The K_f values lay between 209 (for quartz) and 1170 (sediment from a clay pit near Wiesloch). A significant dependence of adsorption and desorption isotherms on sediment parameters could not be determined. The adsorption processes are subject to an entropic effect that is influenced by the solution characteristics. So-called "hydrophobic bonding" is the result.

In bioaccumulation experiments the transfer of Benzo(a)pyrene from contaminated sediment into sediment-living organisms (Tubificidae) was investigated. The factors of transfer thus determined were in the range of 1. Major factors influencing the accumulation of Benzo(a)pyrene in tubificidae included temperature and the type of sediment.

There was insufficient evidence to indicate that the uptake processes occurred from Benzo(a)pyrene concentrations in interstitial water; mobilization processes from sediment during intestinal passage probably played a role, but this has not as yet been clearly defined.

Einführung

Zur Ökotoxikologischen Beurteilung von Chemikalien ist die Kenntnis ihrer Toxizität zunächst von entscheidender Bedeutung. Das gesamte Ausmaß einer potentiellen Gefährdung von Ökosystemen, den Menschen einbezogen, muß erkannt werden, sowohl was akute als auch chronische Wirkungen angeht. Kenntnisse über das toxikologische Potential einer Chemikalie allein reichen allerdings zur Beurteilung nicht aus. Vielmehr ist eine sinnvolle Risikoabschätzung nur dann möglich, wenn Angaben über die Expositionskonzentrationen mit einbezogen werden. Chemikalien hoher Toxizität, welche in geringen Umweltkonzentrationen auftreten, sind weniger gefährlich, während gering toxische Substanzen hoher Expositionskonzentration gefährlicher einzustufen sind (KIMMERLE, 1980).

In aquatischen Systemen wird das Umweltverhalten von Schadstoffen, ihre Dynamik, Mobilität und biologische Wirkung im wesentlichen durch die Reaktion mit dem Wasser und den Feststoffen bzw. den Sedimenten geprägt. Besonders unpolare organische Verbindungen liegen in aquatischen Systemen nur zum geringen Teil in gelöster Form vor. Der weitaus größte Teil ist entweder partikulär oder an Feststoffe gebunden. Über Sedimentationsvorgänge können solche Stoffe dem freien Wasserkörper entzogen und am Boden deponiert werden. In den Sedimenten, wie in einer Falle fixiert, bilden sie ein Reservoir, aus welchem die Schadstoffe unter bestimmten Bedingungen wieder freigesetzt werden können (PECK et al. 1980). Löslichkeit, Flüchtigkeit, Adsorptions- und Desorptionsverhalten sind Parameter, welche das Umweltverhalten einer Chemikalie in aquatischen Systemen nachdrücklich beeinflussen und demnach auch zur Beurteilung herangezogen werden können.

Die biologischen Auswirkungen ihrerseits sind von diesen physikalisch-chemischen Parametern beeinflusst. Durch die Sorption von Schadstoffen an Festkörper wird die Verfügbarkeit für Wasserorganismen stark herabgesetzt

(OSBERGY, 1970), da sich biologische Vorgänge weitgehend im freien Wasser abspielen.

Aufnahme aus dem Wasser, Anreicherung, Mobilisation, Abbau und Persistenz innerhalb aquatischer Nahrungsnetze geben Aufschluß über Auswirkungen auf die Gesundheitsrisiken für den Menschen.

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), die ihre Verbreitung im wesentlichen durch industrielle pyrolytische Prozesse (Koksgewinnung) und Verbrennung fossiler Brennstoffe erfahren, sind mittlerweile in fast allen Gewässern der Erde z.T. in hohen Konzentrationen nachzuweisen. Durch ihre krebsauslösende bzw. cocarzinogene Wirkung sind sie auch unter toxikologischen Gesichtspunkten schon lange von großer Bedeutung. Zwar ist verschiedentlich über das Vorkommen von PAH in der Umwelt (Oberflächengewässer, Sedimente, Organismen) berichtet worden (ANDELMAN; SUESS, 1970; HARRISON et al., 1974; UBA-Bericht, 1978), über Sorptions- und Akkumulationsprozesse, besonders in Verbindung mit biologischen Auswirkungen, ist nur spärliches Datenmaterial erhältlich.

In einem Teilaspekt dieser Arbeit sollte anhand von Benzo(a)pyren, einer Leitsubstanz aus der Gruppe der PAH, das Geoakkumulationsverhalten, also die Fähigkeit von Sedimenten zur Bindung und Anreicherung von Schadstoffen untersucht werden, um das davon bedingte Umweltverhalten beurteilen zu können.

Sedimentbewohnende Organismen (Tubificiden) stellen in mäßig bis stark verunreinigten Gewässern z.T. ein erhebliches Biomassenreservoir dar, welches auch als Nahrungsquelle für Fische große Bedeutung besitzt. In wie weit unpolare Schadstoffe wie das B(a)P aus dem Sediment über Tubificiden dem aquatischen Nahrungsnetz wieder zugeführt werden, sollte in einem zweiten Aspekt dieser Arbeit durch Bestimmung der Bioakkumulation untersucht werden.

Material und Methode

1. Auswahl der Mineralien und natürlichen Sedimente

Die in dieser Arbeit verwendeten Monomineralien Montmorillonit, Kaolinit und Illit entstammen der Institutssammlung. Die natürlichen Sedimente stammten von Probennahmen, die innerhalb verschiedener Projekte des Instituts für Sedimentforschung in Heidelberg durchgeführt wurden. Es handelte sich durchweg um Kastengreiferprobenmaterial. Die Proben wurden so ausgewählt, daß möglichst große Unterschiede hinsichtlich bestimmter Parameter, wie Tongehalt und organischem Kohlenstoffgehalt zu erwarten waren.

Die Sedimente, die innerhalb dieses Projekts Verwendung fanden, entstammen folgenden Bildungsräumen: Bodensee (aus der Seemitte), Rhein (Niederrhein bei Wesel), Neckar (Schleuse Guttenbach), Weser (Nähe Bremen), Elsenz (Neu- benfluß des Neckars), Watt (Nordsee), Wiesloch (Sediment aus einer Tongrube) Klärschlamm. Von den natürlichen Sedimenten wurde die Fraktion $<63\mu\text{m}$ ge- wonnen und für die Experimente benutzt.

2. Charakterisierung der Tonmineralien und Sedimente

Jede der Mineralien bzw. Sedimentproben wurde zur Charakterisierung nach pH-Wert, spezifischer Oberfläche, Kationenaustauschkapazität, organischem Kohlenstoffgehalt und Tongehalt entsprechenden Analysenmethoden unterworfen.

3. Reagenzien und Messungsmethodik

Benzo(a)pyren, im folgenden B(a)P abgekürzt, wurde in diesen Untersuchungen als radioaktiv markierte Verbindung eingesetzt. $7,10\text{-}^{14}\text{C-B(a)P}$ wurde von der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen. Die Verbindung mit einer radioaktiven Konzentration von $50\mu\text{Ci}$ besaß eine spezifische Aktivität von $21,7\text{mCi/mmol}$, bei einem Molekulargewicht von 253g/mol (bei dieser speziellen Aktivität) und einer radiochemischen Reinheit von 99%. Alle übrigen Substanzen und Lösungsmittel waren p.a. Chemikalien. $7,10\text{-}^{14}\text{C-B(a)P}$ wurde mit einem Flüssigkeitsscintillator (Mark III) der Fa. Nuclear, Chicago, detektiert. Als Scintillationsflüssigkeit wurde im wesentlichen der für wässrige Proben geeignete Scintillator Unisolve 100 der Fa. Zinser in Frankfurt benutzt.

4. Adsorptionsexperimente

Zur Prüfung des Adsorptionsverhaltens von B(a)P wurden insgesamt drei Adsorptionstechniken angewendet.

"Normale" Adsorption

Hierbei wurden B(a)P-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt und mit diesen die Sorption durchgeführt.

"Additive" Adsorption

An dasselbe Adsorbens wurde mehrmals eine Adsorption durchgeführt, indem nach Einstellung des Gleichgewichtszustands der Überstand entfernt und zur Messung herangezogen wurde und mit frischer Adsorptionslösung ein weiterer Adsorptionsschritt hinzugefügt wurde. Diese Adsorptionstechnik erlaubte es, die normalerweise aufgrund der geringen Löslichkeit von B(a)P ($4,5\text{ppb}$) niedrige Konzentrationsgrenze nach oben zu erweitern.

"Adsorptives" Verfahren

Auch hier handelte es sich um ein Verfahren, bei welchem der Einsatz höherer Adsorbatkonzentrationen im Sorptionsexperiment möglich wurde. B(a)P wurde zunächst in acetoniger oder toluoliger Lösung an die Wände der Adsorptions-

gefäße adsorbiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im N_2 -Strom wurden Adsorbens und Aqua dest hinzugefügt und die eigentliche Adsorption durchgeführt (MEANS et al., 1980).

Die Herstellung der wässrigen B(a)P-Lösung erfolgte so: Eine entsprechende etwa eineinhalbfach über der theoretischen Löslichkeit liegende Menge B(a)P wurde in einem organischen Lösungsmittel in ein Vorratsgefäß gegeben. Das Lösungsmittel wurde im N_2 -Strom entfernt. Eine entsprechende Menge Aqua dest wurde hinzugefügt und die Lösung auf dem Magnetrührer 48h gerührt. Die Lösung wurde dann nach weiteren 48h vorsichtig über Glaswolle in ein anderes Gefäß überführt. Die so gewonnene Lösung besaß eine B(a)P-Konzentration von 3,5-4,5ppb.

Das Sorptionsexperiment im Batchversuch dauerte i.a. 48h, nachdem reaktionskinetische Untersuchungen die Erreichung des Equilibriums bei Montmorillonit nach 24h ergeben hatten. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurden die Proben 60min bei 3400U/min zentrifugiert und aus der wässrigen Phase Aliquots zur Messung im Flüssigkeitsscintillationszähler entnommen. Die Ausgangs- und Endkonzentrationen wurden ermittelt und zur Bestimmung der adsorbierten Menge durch Differenzenbildung herangezogen. Zur Erstellung einer echten Massenbilanz und damit zur Erfassung von B(a)P-Verlusten wurden exemplarisch auch am Adsorbens selbst die B(a)P-Konzentrationen bestimmt. Hierzu wurde das Adsorbens getrocknet, bestimmte Mengen entnommen und diese fein gemörsert. Dieser Probenanteil wurde dann einer mehrfachen Desorption mit organischen Lösungsmitteln unterzogen. Eine erste Desorption mit Aceton (diente der Benetzung) und weitere Desorptionsschritte mit Toluol hatten sich gut bewährt.

5. Desorptionsversuche

Zur Untersuchung des Remobilisationsverhaltens von an Feststoffen adsorbiertem B(a)P wurden Desorptionsversuche durchgeführt. Nach dem jeweiligen Adsorptionsexperiment wurde die wässrige Phase entfernt und mit Aqua dest 48h desorbiert. In der wässrigen Phase wurde dann der mobilisierte Anteil von B(a)P bestimmt. In der Regel wurden 4-5 Desorptionsschritte nach dem gleichen Verfahren hintereinander durchgeführt.

Sämtliche Sorptionsversuche wurden unter Lichtabschluß durchgeführt, um photolytischen Abbau von B(a)P zu vermeiden. Die Ermittlung der einzelnen Sorptionsdaten erfolgte über eine Doppelbestimmung.

6. Herstellen eines belasteten Sediments

Jeweils 30g Sediment wurden mit etwa 50ml Aqua dest suspendiert und auf dem Magnetrührer gerührt. Eine der gewünschten Belastung entsprechende B(a)P-Menge wurde in 10ml Äthanol gelöst und diese Lösung tropfenweise in die Sedimentsuspension gegeben. Diese Suspension wurde noch etwa 8h gerührt, wobei sich das B(a)P fast vollständig und homogen an die Festsubstanz verteilte. Danach wurde die Suspension im Wärmeschrank bei 50°C getrocknet.

7. Transfer in Tubificiden

In Transferversuchen wurde die B(a)P-Akkumulation aus belastetem Sediment in sedimentbewohnende Organismen (Tubificiden) untersucht. Ein geeignetes Aufzuchtmodell, welches die Aufzucht einer Species (Tubifex tubifex) gewährleistet, wurde hierfür entwickelt. Zur Untersuchung der Akkumulationskinetik fand folgendes System Anwendung: Das belastete Sediment wurde in Glasröhren eingefüllt und mit einer etwa 5-8cm hohen Wassersäule überschichtet. Durch zwei Kapillaren wurde ein ständiger Zu- und Abfluß von künstlichem Flußwasser mittels einer Schlauchpumpe erzeugt und damit ein turn-over der Wassersäule über dem Sediment erreicht.

Etwa 15-20 Tubificiden pro Versuchsansatz wurden auf das Sediment aufgebracht und der Transferversuch unter Lichtabschluß bei konstanten Temperaturbedingungen 14 bzw. 28 Tage durchgeführt.

8. Bestimmung des B(a)P-Gehalts im Porenwasser

Um den Einfluß der B(a)P-Konzentration im Porenwasser auf die Akkumulationskinetik in die Tubificiden abschätzen zu können, wurde ein Verfahren zur B(a)P-Bestimmung im Porenwasser entwickelt.

Einzelne Sedimentschichten wurden nach Versuchsdauer über einem Membranfilter ($<0,45\mu$) mit N_2 -Gas entwässert. Bei diesem Prozeß adsorbierte die gesamte im Porenwasser befindliche B(a)P-Menge an das Membranfilter. Über die Bestimmung der B(a)P-Konzentration im Membranfilter konnte auf die B(a)P-Konzentration des Porenwassers rückgeschlossen werden.

9. Messung des B(a)P-Gehalts

Die im Restsediment befindlichen Tubificiden wurden zunächst aus dem Sediment ausgewaschen und zur vollständigen Entleerung des Darmes etwa 24h auf Quarzsand gesetzt. Darauf erfolgte die Trocknung im Gefriertrockner, dann die Auflösung in einem Solubilizer (quartäres Ammoniumhydroxid) und die Detektion in einem geeigneten Scintillator durch Flüssigkeitsscintillation.

Inwieweit B(a)P während der Versuchsdauer bestimmten Abbauprozessen unterlag,

wurde mittels dünnenschichtchromatographischer Methoden (Dünnschichtplatten mit einer Beschichtung aus acetylierter Cellulose und Aluminiumoxid) in einem n-Hexan-Benzol (9:1) und Methanol-Diäthyläther-H₂O (4:4:1) Gemisch untersucht. Die Detektion erfolgte durch Fluorescens im UV-Licht (ANONYMUS, 1976).

Der Nachweis eines B(a)P-Abbaus in Komponenten anderer Rf-Werte fiel mit dieser Methode negativ aus, so daß man schließen kann, daß kein wesentlicher B(a)P-Metabolismus bei diesen Versuchsbedingungen vonstatten ging.

Ergebnisse und Diskussion

1. Geoakkumulation

Die physikalisch-chemische und mineralogische Charakterisierung der Tonminerale und der natürlichen Sedimente ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle I Charakteristika der Tonminerale und Sedimente

Mineral/Sediment	Org.C (%)	spez.Oberfl. (m ² /g)	pH (1:100)	CEC (meg/100g)	Tone (%)
Montmorillonit	0	70,2	9,0	47,6	90
Illit	0	21,9	7,1	9,1	75
Kaolinit	0	13,3	7,2	4,0	95
Wiesloch	1,8	47,1	8,5	19,0	72
Bodensee	1,0	4,3	8,5	5,3	39
Rhein	7,1	11,1	7,5	16,7	50
Weser	4,3	13,5	7,9	25,2	54
Watt	3,0	9,9	8,6	16,4	45
Neckar	4,2	12,7	8,2	21,3	54
Klärschlamm	12,0	5,9	8,9	6,4	23
Elsenz	2,1	6,1	7,8	12,1	37

Die ermittelten Adsorptionsdaten aller drei Verfahren lassen sich gut mit

Freundlich-Adsorptions-Isothermen beschreiben: $x/m = k_f \cdot C_{eq}^{1/n}$

Es ist x/m = adsorbierte Menge BaP pro Menge Adsorbens (auf 1g) berechnet

C_{eq} = Gleichgewichtskonzentration (BaP in Lösung)

k_f = Freundlich Adsorptionskonstante

$1/n$ = Steigung der Adsorptions-Isothermen

Zur vereinfachten Darstellung wird außerdem die lineare Verteilungsgleichung

$x/m = k_p \cdot C$ mit aufgeführt (x/m = sorbierte Menge, C = Gleichgewichtskonzentration in Lösung, k_p = Verteilungskoeffizient).

Verschiedentlich wird eine direkte proportionale Abhängigkeit der Adsorption unpolarer organischer Moleküle vom organischen Kohlenstoffanteil natürlicher Sorbentien (Sedimente, Böden) beschrieben. Zwecks besserer Beurteilung und Vergleichbarkeit der individuellen Adsorptionskonstanten k_f unabhängig vom organischen Kohlenstoffgehalt, wird diese nach der folgenden Beziehung normiert und der k_{oc} Wert als Vergleichsgröße hinzugezogen (KARICKHOFF et al., 1979; MEANS et al., 1980).

$$k_{oc} = k_f \cdot 100 / \text{org C\%}$$

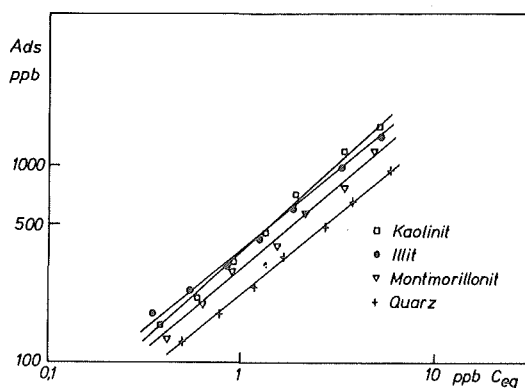
Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse von Adsorptionsversuchen wieder (ermittelt durch normale und additive Adsorption bei einem Adsorbens/Lösungsverhältnis von 1:100).

Tabelle 2 Adsorptionskonstanten

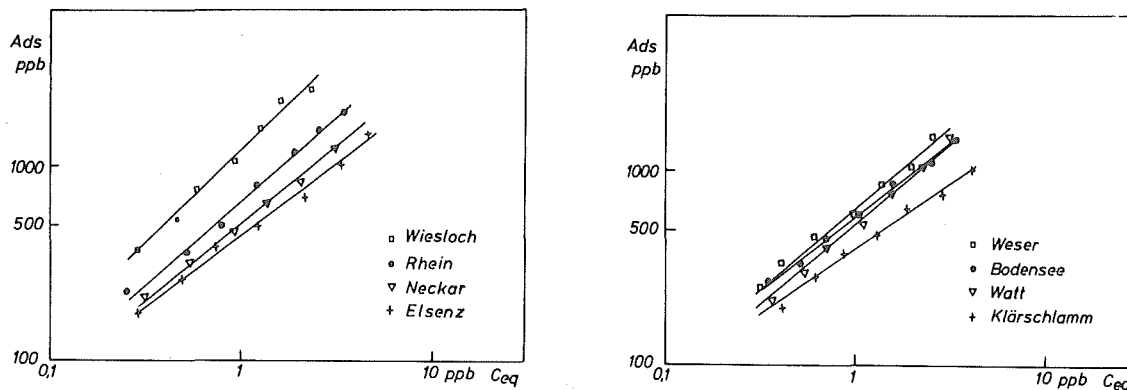
Min/Sed	k_f	1/n	k_p	k_{oc}
Montmorillonit	254	0,736	217	-
Illit	300	0,763	240	-
Kaolinit	320	0,703	258	-
Quarz	209	0,713	185	-
Wiesloch	1169	1,046	983	64940
Bodensee	634	0,929	614	63400
Rhein	625	0,842	677	8800
Weser	624	0,992	530	14510
Watt	596	1,012	559	19870
Neckar	575	1,071	420	13690
Klärschlamm	456	0,937	453	3800
Elsenz	447	1,097	350	21290

Exemplarisch sollen die nächsten Abbildungen den Verlauf der Adsorptionsisothermen verdeutlichen.

Abbildung 1 Adsorptionsisothermen für die Sorption von B(a)P an Tonmineralien



Abbildungen 2 und 3 Adsorptionsisothermen für die Sorption von B(a)P an natürliche Sedimente



Anhand der ermittelten Adsorptionsdaten läßt sich eine deutliche Steigerung der Adsorptionsstärke von den Tonmineralien zu den natürlichen Sedimenten feststellen. Die Adsorptionsstärke der aquatischen Sedimente ist dabei etwa doppelt so hoch wie die der Tonmineralien. Der bei natürlichen Sedimenten hinzukommende organische Kohlenstoffgehalt kann für diese Steigerung der Adsorptivität verantwortlich gemacht werden. Innerhalb der Reihe der natürlichen Sedimente jedoch läßt sich im Gegensatz zu den Untersuchungen von KARICKHOFF und MEANS keine lineare Steigerung der Adsorptionsstärke in Abhängigkeit von Kohlenstoffgehalt beobachten. Verdeutlicht wird dies durch die nicht einheitlichen K_{oc} -Werte wie durch die Korrelationsmatrix zwischen C und den K_f -Werten ($r=-0,387$). Dieses Ergebnis wird auch von HERRMANN (1981) bestätigt.

Deutliche bzw. signifikante Korrelationen ergaben sich nur zwischen k_f und der spezifischen Oberfläche ($r=0,961$) sowie zwischen k_f und dem Tongehalt ($r=0,837$). Fügt man bei der Berechnung der Korrelationsmatrices die Daten der Tonmineralien hinzu, werden diese Beziehungen jedoch nicht mehr bestätigt.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der unterschiedlichen Adsorptionstechniken am Beispiel des Bodenseesediments diskutiert werden. Variationen im Adsorbens-Adsorptionslösungsverhältnis bei sonst gleichen Versuchsbedingungen führen zu folgenden Ergebnissen:

Adsorbens/Lösung	k_f
1:250	629
1:100	524
1:50	312
1:25	172

Als k_f -Wert für die additive Adsorption wurden 584 ermittelt. Bei der adsorptiven Methode sogar ein vielfaches davon, nämlich 18000.

Dieser letzte Wert hat jedoch nur theoretische Bedeutung. Da im Adsorptionsexperiment die Lösungsphase nie eine höhere Konzentration an B(a)P als deren theoretische Löslichkeit aufweisen kann, besteht darin eine limitierende Größe. Die Adsorptionsisotherme selbst gleicht sich asymptotisch mit großer Steigung diesem Limit an, wodurch sich der hohe k_f -Wert erklärt.

Die am Bodensee gewonnenen Adsorptionsdaten veranschaulichen die Unterschiedlichkeit der Ergebnisse in Abhängigkeit zu den Versuchsbedingungen. Vergleichende Überprüfung mit in der Literatur beschriebenen Adsorptionsdaten schwerlöslicher unpolarer Verbindungen weisen ebenfalls erhebliche Unterschiede auf. Hier wird deutlich, welche grundlegende Beeinflussung des Adsorptionsvorgangs von der Methode selbst ausgeht. Die grundlegende Bewertung des Geoakkumulationsverhaltens von Umweltchemikalien ist auf diesem Hintergrund, besonders was die Vergleichbarkeit von Analysendaten angeht, sehr schwierig. Aus diesem Grund ist unbedingt eine Vereinheitlichung von Adsorptionsmethoden bzw. die Ausarbeitung von Normvorschriften zu fordern.

Zur Erklärung des Adsorptionsmechanismus ist ein Phänomen besonders wichtig. Die in Experimenten unterschiedlichen Adsorbens/Lösungsverhältnis gewonnenen Adsorptionsdaten zeigen starke Unterschiede in den ermittelten k_f -Werten. Beurteilt man jedoch die absoluten Mengenkonzentrationen von B(a)P in Lösung bzw. auf dem Adsorbens, werden die Unterschiede deutlich geringer. Dies bedeutet, daß die unterschiedlichen Adsorptionskonstanten zum Teil rechnerische Produkte verschiedener Verdünnungsfaktoren sind. Da die B(a)P-Konzentrationen in der Lösungsphase gar nicht so sehr variieren, wird klar, daß das Verhalten von B(a)P in einem solchen System wesentlich durch seine Lösungseigenschaften gesteuert wird.

Lösungsverhalten und Entropieeffekte müssen im wesentlichen für die Adsorptionsvorgänge verantwortlich gemacht werden. Nach einer Theorie von HAMAKER und THOMPSON (1972) spielt sich beim Einbringen von unpolaren Organomolekülen (z.B. Kohlenwasserstoffe) in Wasser folgendes ab: Wasser besteht im flüssigen Aggregatzustand aus einer Mischung von Molekülen eisähnlicher Gitterstruktur, zwischen denen sich freie, nicht gebundene Wassermoleküle bewegen. Beim Einbringen von unpolaren Molekülen bilden die "freien" Wassermoleküle gitterähnliche Strukturen um das Organomolekül. Die hierbei freiwerdende Hydratationsenergie ist jedoch insgesamt geringer als der mit der Abnahme der Entropie

verbundene Energieverlust, so daß dieser Lösungsvorgang thermodynamisch letztlich ungünstig verlaufen würde. Folglich verdrängen die Wassermoleküle die Organomoleküle wieder aus ihrem Verband und diese reagieren ihrerseits mit hydrophoben Gruppen des Adsorbens. Diesen, durch Entropieeffekte beeinflussten Adsorptionsvorgang bezeichnet man als "hydrophobic bonding".

Die hier beschriebenen Ergebnisse scheinen diese Theorie zu bestätigen. Abhängigkeiten der Adsorptionsprozesse von den untersuchten physikalisch-chemischen und mineralogischen Adsorbensparametern sind nicht zu beweisen, so daß ihnen nur eine untergeordnete Rolle zugewiesen werden kann.

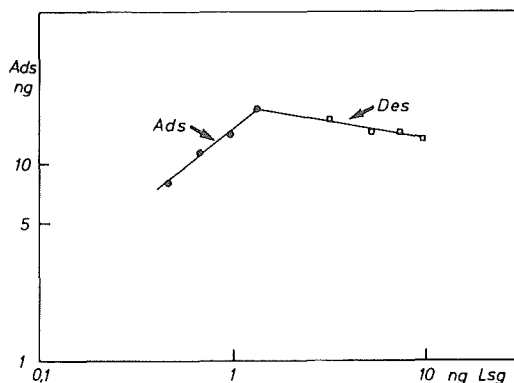
Die ermittelten Desorptionswerte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 3 Desorptionswerte

Sed/Min	Desorbiert (ppb)
Montmorillonit	0,231 \pm 0,082
Illit	0,196 \pm 0,057
Kaolinit	0,187 \pm 0,064
Bodensee	0,103 \pm 0,015
Rhein	0,15 \pm 0,070
Neckar	0,144 \pm 0,051
Weser	0,185 \pm 0,068
Elsenz	0,17 \pm 0,050
Watt	0,219 \pm 0,082
Wiesloch	0,094 \pm 0,045
Klärschlamm	0,197 \pm 0,034

Die mittleren Desorptionswerte (desorbiertes B(a)P in Lösung) liegen zwischen 0,094 ppb und 0,231 ppb. In Abbildung 4 ist exemplarisch eine Desorptionsisotherme am Wassersediment dargestellt.

Abbildung 4 Desorptionsisotherme am Beispiel des Wesersediments
(die zugehörige Adsorptionsisotherme ist mit aufgeführt)

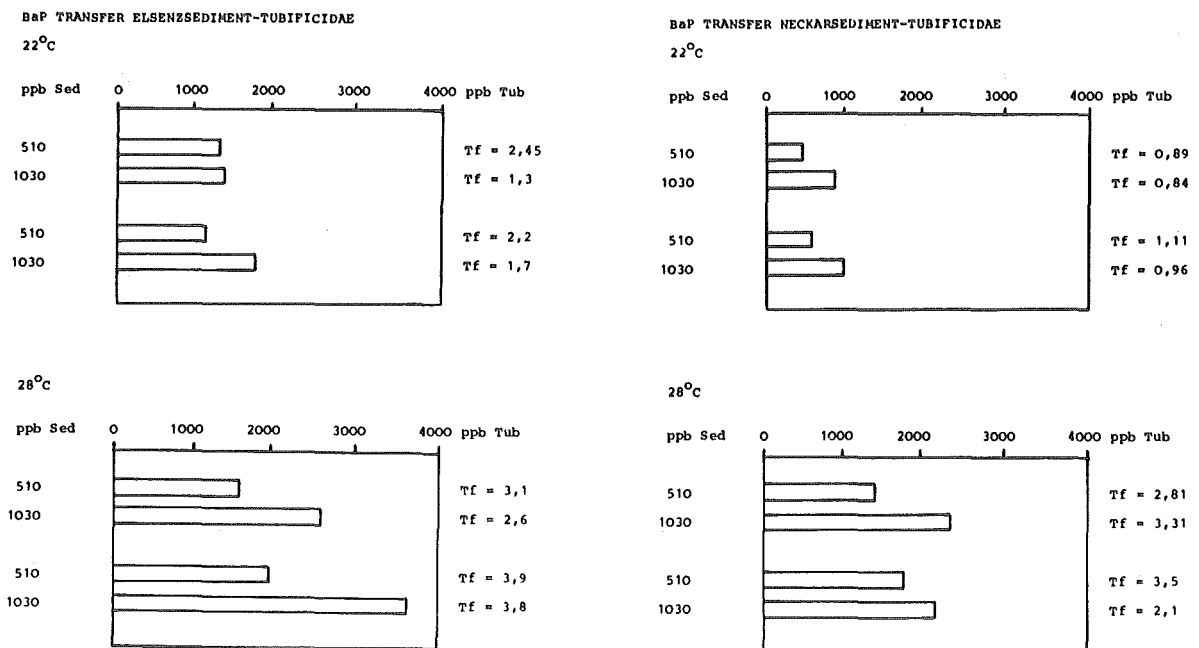


Anhand der geringen Steigung der Desorptionsgeraden wird deutlich, daß B(a)P stark an das Adsorbens gebunden ist und eine vollständige Eliminierung vom Sediment erst über sehr zahlreiche Desorptionsschritte möglich ist. In der Natur treten Desorptionsprozesse solcher Intensität nur im Falle größerer Sedimentaufwirbelungen auf. Physikalisch-chemische Mobilisierungseffekte dürfen daher nur in Fließgewässern eine größere Rolle spielen. Auch am Beispiel der Desorptionsexperimente ist keine signifikante Abhängigkeit von den Adsorbensparametern zu erkennen. Auch hier werden die Prozesse im wesentlichen durch die Lösungseigenschaften von B(a)P im Wasser beeinflusst.

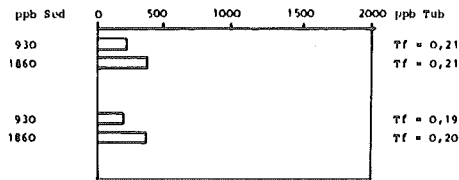
2. Bioakkumulation

Im folgenden sind die Ergebnisse der Bioakkumulationsversuche aufgeführt. Variable Parameter sind Ausgangskontamination der Sedimente, Versuchstemperaturen, verschiedene Sedimente und Versuchsdauer. Links sind die Ausgangskonzentrationen im Sediment dargestellt, die Grafik veranschaulicht die B(a)P-Konzentrationen in den Tubificiden, rechts sind die entsprechenden Transferfaktoren Tubificiden/Sediment angegeben. Paarweise bzw. als Tripletts sind die Ergebnisse nach unterschiedlicher Versuchsdauer (14 Tage, 28 Tage) untereinander angeordnet.

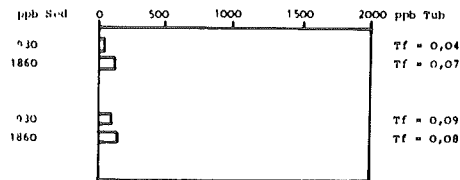
Abb. 5-8 Transfer von B(a)P in Tubificiden



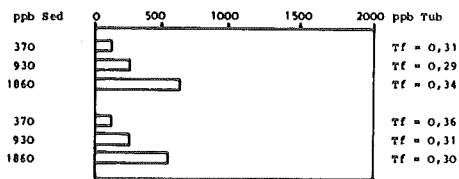
BaP TRANSFER RHEINSEDIMENT-TUBIFICIDAE
8°C



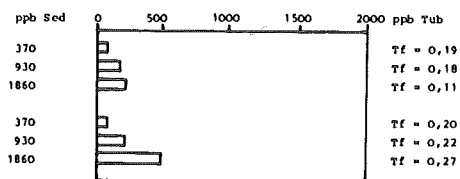
BaP TRANSFER ROERSESSEDIMENT-TUBIFICIDAE
8°C



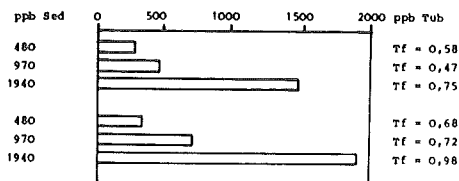
16°C



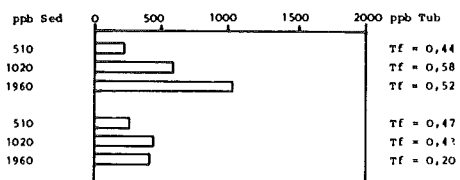
16°C



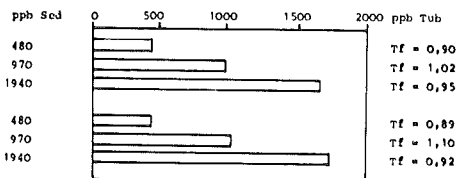
22°C



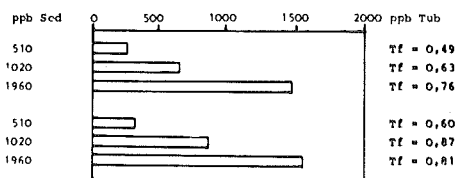
22°C



28°C



28°C



Die ermittelten Transferfaktoren liegen i.a. unter 1. Ausnahmen bilden hierbei die Transferfaktoren beim Elsenzsediment und bei Versuchstemperaturen von 28°C. In der Natur treten solche Temperaturen nur in Ausnahmefällen auf. Eine Mobilisierung von B(a)P in natürlichen aquatischen Systemen aus dem Sediment in sedimentbewohnende Organismen dürfte demnach in keinem bedeutenden Umfang stattfinden. B(a)P ist also eine Umweltchemikalie geringer Bioverfügbarkeit.

Bei der Beurteilung der Transferfaktoren wird zunächst eine signifikante Abhängigkeit von der Versuchstemperatur deutlich. Bis zum 10-fachen höher sind die Aufnahmeraten bei einer Versuchstemperatur von 28°C gegenüber einer von 8°C. Dies stimmt mit der allgemeinen Bedeutung der Temperatur für Stoffwechselleistungen von Organismen überein. Physiologische Abläufe werden innerhalb biologisch tragbarer Grenzen mit steigender Temperatur beschleunigt. Bei einer Versuchstemperatur von 8°C sind die Versuchstiere physiologisch fast inaktiv, so daß keine nennenswerten Aufnahmeraten zu verzeichnen sind. Erst mit höheren Temperaturen werden die Tubificiden aktiv und nehmen auch Schadstoffe in hö-

heren Konzentrationen auf.

Weiterhin wird die Transferrate wesentlich von der Art des Versuchsediments beeinflusst. Beim Bodenseesediment werden die vergleichsweise niedrigsten Transferfaktoren (0,44 bei 22°C), beim Elsenzsediment die höchsten (1,9 bei 22°C) gemessen, was einer relativen Zunahme um etwa das 4,3fache entspricht. Die Ergebnisse können durch die unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften erklärt werden. Das Elsenzsediment mit den vergleichsweise schlechtesten Adsorptionseigenschaften besitzt umgekehrt die beste Biomobilität. Das Bodenseesediment mit einer relativ schlechten Bioverfügbarkeitsrate zeichnet sich hingegen durch gute Adsorptionseigenschaften aus.

Diese Beobachtungen sollten sich durch die Messung der B(a)P-Gehalte im Porenwasser bestätigen lassen. Zwar lagen die Porenwasserkonzentrationen von B(a)P beim Elsenzsediment mit durchschnittlich 0,78 ppb (22°C) am höchsten, die Gehalte bei den übrigen Sedimenten zwischen 0,36 ppb (Rhein) und 0,47ppb (Bodensee). Zumal bei einer Versuchstemperatur von 28°C die B(a)P-Konzentrationen im Porenwasser wieder abnahmen, kann man davon ausgehen, daß die Aufnahme von B(a)P über das Porenwasser nicht befriedigend erklärt werden kann. Mobilisationsvorgänge bei der Passage des Sediments durch den Darm der Tubificiden dürften hier eine, wenn auch ungeklärte Rolle spielen.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß über die Bestimmung der Bioakkumulation das Verhalten von B(a)P in Bezug auf eine Mobilisation innerhalb biologischer Systeme weitaus differenzierter erfaßt wird, als dies durch Bestimmung physikalisch-chemischer Sorptionsparameter geschehen kann. Eine grundsätzliche Beurteilung von Schadstoffen auf ihr Umweltverhalten in aquatischen Systemen ist durch die Bestimmung ihrer physikalisch-chemischen Parameter nicht ausreichend möglich und machen biologische Transferstudien unerlässlich.

Schlußfolgerungen

B(a)P ist eine wenig mobile Substanz, welche aufgrund ihrer geringen Löslichkeit sehr gute Sorptionseigenschaften besitzt. In aquatischen Systemen wird sie vor allem an die Feststoffphase sorbiert und in Sedimenten deponiert anzutreffen sein. Aufgrund ihrer geringen Desorptionseigenschaften fungieren Sedimente für B(a)P als Schadstofffalle, so daß B(a)P im freien Wasser keine wesentlichen Wirkungen zeigen wird. Insofern sind auch die biologischen Auswirkungen als gering einzuschätzen, B(a)P ist für die meisten Wasserorganismen eine wenig verfügbare Substanz. Nur in Systemen, in denen Tubificiden ein großes Biomassenreservoir und eine bedeutende Nahrungsquelle für Fische bilden, ist eine nennenswerte Weitergabe von B(a)P zu erwarten.

Literatur

1. Andelman, J.B. & Suess, M.J.: Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. Bull.Wld.Hlth.Org., 43, 479-508 (1970).
2. Anonymus: Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK). Vom Wasser, 47, 469-479 (1976).
3. Hamaker, J.W. & Thompson, J.M.: Adsorption. In: C.A.I. Goring, J.W. Hamaker (eds.), Organic chemicals in the soil environment. Marcel Dekker, Inc., New York, 49-144 (1972).
4. Harrison, R.M, Perry, R. & Wellings, R.A.: Review Paper: Polynuclear aromatic hydrocarbons in raw, potable and waste waters. Water Research, 9, 331-346 (1975).
5. Herrmann, R.: Transport of polycyclic aromatic hydrocarbons through a partly urbanized river basin. Water, Air, and Soil Pollution, 16, 257-262 (1981).
6. Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J. & Banwart, W.L.: Sorption of polynuclear hydrocarbons by sediments and soils. Environ. Science & Technol., 14, 1524-1528 (1980).
7. Karickhoff, S.W., Brown, D.S. & Scott, T.A.: Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. Water Research, 13, 241-248 (1979).
8. Kimmerle, R.A.: Aquatic hazard evaluation state of the art. In: R. Haque (ed.), Dynamics, exposure and hazard assessment of toxic chemicals. Ann Arbor Science Publ., Inc., Michigan, 451-457 (1980).
9. Osberg, J.M.: Sorption of un-ionized pesticides by soils. In: Sorption and transport process in soils. Monograph 37, Soc. of Chem.Ind., London, 63-77 (1970).
10. Peck, D.E., Corwin, D.L. & Farmer, W.J.: Adsorption - desorption of Diuron by freshwater sediments. J. Environ. Qual., 9, 101-106 (1980).
11. Umweltbundesamt: Luftqualitätskriterien für ausgewählte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. UBA-Bericht 1/1979, Erich Schmidt Verlag, Berlin, 270 S.

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7235)

"Untersuchungen zur Nutzbarmachung künstlicher Gewässeranlagen
für die ökotoxikologische Prüfung von Chemikalien
(Prüfsystem für Ökoteste)"

Berichterstatter: Dr. P.-D. Hansen

Bearbeiter: Dr. U. Schiecke

Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene
des Bundesgesundheitsamtes

Berlin

Institutsleiter:

Prof. Dr. K. Aurand

Mai 1982

Summary

1. Investigations on how to provide ecosystems in artificial ponds (volume 100 m^3 ; surface area 100 m^2) were carried out. The ponds were filled with water of different origin and composition. The species and numbers of the planctonic organisms in the artificial ponds were determined.
2. To obtain a better reproducibility of data and comparable growth rates, the experiments were continued in smaller units: volumes of 50, 25 and 10 m^3 .
3. Experiments (Cross-over exchange of water fillings) were carried out to ensure equal growing rates and comparable variations of the species in the ponds (volume $=10 \text{ m}^3$).
4. The composition and numbers of the planctonic species were dominated by the green algae. The zooplankton and the planctonic species in general were very poor.

It was confirmed that the biocoenosis of the planctonic organisms in artificial ponds could be a tool for ecotoxicological testing of chemicals under field situations. Criteria for the suitability are discussed.

5. The studies on the basis of the present results, should be continued in stabilized ecosystems; further experiments are proposed.

Zusammenfassung

1.) Es werden Experimente zur Bereitstellung von Ökosystemen in Betonteichen mit einem Volumen von ca. 100 m^3 und einer Wasseroberfläche von 100 m^2 durchgeführt. Die Wasserkörper sind unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung; Art und Häufigkeit der sich in den Betonteichen entwickelnden Planktonorganismen wird geprüft.

2.) Um eine bessere Reproduzierbarkeit derartiger Systeme zu erhalten, wurden die Experimente in Untereinheiten der 100 m^3 -Teiche: $2 \times 50 \text{ m}^3$ und $4 \times 25 \text{ m}^3$ fortgesetzt. Nachdem sich zum biologischen "Gleichlauf" auch hier nicht der gewünschte Erfolg einstellte, wurden die Experimente in einem nochmals verkleinerten System von 2×3 Betonbecken mit jeweils 10 m^3 Wasserinhalt durchgeführt.

3.) Zum biologischen "Gleichlauf" werden die Versuche (Teichserie 1 + 2) - hier Überkreuzaustausch genannt - beschrieben und die Ergebnisse dargestellt.

4.) Die Zusammensetzung und Häufigkeit der in den Betonbecken vorkommenden Planktonarten zeigt ein Überwiegen der Grünalgen und ein nur geringes Zooplankton. Insgesamt war das sich entwickelnde Plankton artenarm.

Man gelangt zu der Auffassung, daß die in den Betonteichen auftretenden Planktonzönosen eine geeignete Basis für die ökotoxikologische Freilandprüfung von Chemikalien sind. Die Eignungskriterien werden diskutiert.

5.) Die experimentellen Ergebnisse geben Anlaß für weiterführende Untersuchungen mit stabilisierten Ökosystemen. Hierzu wird ein neuer Versuchsansatz aufgezeigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Programm, Methodik und zeitlicher Ablauf der Untersuchungen
3. Ergebnisse
 - 3.1 Die Betonteiche als künstlicher Lebensraum im Vergleich mit natürlichen Gewässern
 - 3.2. Die Planktonentwicklung in den Betonteichen
 - 3.2.1 Die Entwicklung des Planktons unter den gegebenen Freilandbedingungen
 - 3.2.1.1 Startphase
 - 3.2.1.2 Vegetationsperiode 1980 und 1981
 - 3.2.2 Die Entwicklung des Planktons bei gesteigerter Turbulenz und erhöhtem Nährstoffangebot
 - 3.2.3 Zusammenfassende Charakterisierung des Planktons in den Betonteichen
 - 3.3 Untersuchungen zum Benthos in den Betonteichen
4. Diskussion der Ergebnisse
 - 4.1 Strukturelle und funktionelle Eignung der Planktonzönosen als Chemikalien-Prüfsystem
 - 4.2 Vergleichbarkeit ("Gleichlauf") der biologischen Entwicklung in den Versuchsteichen
 - 4.3 Weiterführende Untersuchungen

1. Einleitung

Das F+E-Vorhaben sollte einen Beitrag zur Klärung der Frage nach Einsatzmöglichkeiten künstlicher Gewässeranlagen zur Freilandprüfung von Chemikalien auf deren umweltgefährdende Eigenschaften erbringen. Dabei war in erster Linie an die spätere Untersuchung von Chemikalienlangzeitwirkungen gedacht, die sich auf der Organisationsstufe aquatischer Lebensgemeinschaften manifestieren und für diese subletalen Charakter besitzen.

Der Einsatz künstlicher Gewässeranlagen zur Chemikalienprüfung stellt ein Bindeglied zwischen Labortests und entsprechenden Untersuchungen in natürlichen Gewässern dar. Bei einem Mindestumfang gesicherter Analogie zu den Entwicklungsabläufen in den natürlichen Referenzgewässern bieten künstliche Gewässeranlagen den Vorteil einer möglichen Steuerung ökologischer Faktoren (wie Nährstoffeintrag, Lichtklima, Turbulenz, Sedimentmenge und -typ) und besitzen im Fall einer Schadstoffeinbringung den einer gefahrlosen Beseitigung bei Versuchsende und erneuten Einsatzes zur weiteren Chemikalienprüfung.

Die Untersuchungen wurden auf dem Versuchsfeld für spezielle Fragen der Umwelthygiene des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene am Bundesgesundheitsamt durchgeführt. Biologische Basis waren die in mehreren Beton- und Kunststoffteichen in Wasserkörpern unterschiedlicher Herkunft, Qualität und Größe auftretenden Planktongemeinschaften. Auf Eingriffe in deren "natürliche" Entwicklung, etwa durch Steuerung des Nährstoffangebots etc. wurde verzichtet; ebenso sollte in dieser Phase der Untersuchungen noch keine Einbringung von Umweltchemikalien erfolgen.

2. Programm, Methodik und zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

Bei der Planung der Untersuchungen wurde einerseits die limnologische Charakterisierung der künstlichen aquatischen Ökosysteme als auch andererseits die Ausrichtung des F+E-Vorhabens für spätere Freilanduntersuchungen zur ökotoxikologischen Chemikalienprüfung berücksichtigt.

Das Programm der Messungen und Zählungen umfaßte daher einerseits wesentliche Kenngrößen, die allgemein der Charakterisierung aquatischer Lebensgemeinschaften dienen und zugleich eindeutig quantifizierbare Änderungen in der Folge von längerfristigen, subletalen Chemikalienwirkungen erwarten lassen. Andererseits wurden unter den physikalisch-chemischen Meßgrößen insbesondere diejenigen erfaßt, von denen Zusammensetzung und Entwicklung der Biozönosen im besonderen Maße abhängen.

Der Einsatz der Betonteiche: Überlegungen zur Methodik und Kostenoptimierung späterer Versuche mit umweltrelevanten Chemikalien führten bei Untersuchungsbeginn (August 1979) zur Füllung mit unterschiedlichen Wasserqualitäten.

1. Wasser eines natürlichen, stehenden Gewässers:

Die Wahl fiel dabei auf den Berliner Schlachtensee, der den Vorteil aufwies, gleichzeitig von einer anderen Arbeitsgruppe in regelmäßigen Abständen im pelagischen Bereich limnologisch untersucht zu werden. Die Entnahme größerer Wassermengen aus einem Weiher war aus verschiedenen Gründen unmöglich.

2. Aufgearbeitetes Grundwasser aus dem Wasserwerk des Versuchsfeldes.

3. Außerdem wurde eine Mischung beider Qualitäten im Verhältnis 1:4 eingesetzt.

Eine spätere überwiegende Verwendung von aufbereitetem

Grundwasser des Versuchsfeldes hatte neben dem Vorteil ungleich geringerer Kosten den einer Wasserqualität gleicher Herkunft und Zusammensetzung.

Die personelle Ausstattung des Vorhabens hatte zu dem Beschluß geführt, die Untersuchungen hier auf die Planktonzönose als biologische Basis eines anzustrebenden Chemikalienprüfsystems zu konzentrieren. Daher wurde bei der Wasserentnahme aus dem Schlachtensee auf die gleichzeitige Entnahme von Sediment verzichtet. Innerhalb der Versuchsbecken wurde jedoch wegen der intensiven Wechselbeziehungen zwischen Boden und Freiwasser auch die Besiedlung des sich langsam vermehrenden, weitgehend biogenen Sediments als auch die der sedimentarmen Seitenwände verfolgt. Details zur Entwicklung und Zusammensetzung des Benthos enthalten die Zwischenberichte sowie deren Anlagen.

Im Hinblick auf spätere Chemikalienversuche sollten die von den Wasserkörpern erhaltenen Daten folgende Vergleiche erlauben:

1. Zwischen gleichartigen Einheiten mit anfangs verschiedener Wasserbeschaffenheit, um die Auswirkung der letzteren abgrenzen zu können.
2. Zwischen Einheiten unterschiedlicher Größe, jedoch anfangs gleichartiger Wasserbeschaffenheit, um Erfahrungen über die erforderliche Minimalgröße der Becken zu erhalten.
3. Zwischen gleichartigen Einheiten mit ursprünglich gleicher Wasserbeschaffenheit: hier sollten sich Einblicke in den Umfang der natürlichen Variabilität (speziell der Entwicklung der biologischen Besiedlung) ergeben.

Die angestrebten Vergleichsmöglichkeiten und sonstige Überlegungen führten zur Füllung der 1979 zunächst verwendeten großen 100 m^3 Versuchseinheiten. Bei den kleineren, unterteilten Einheiten 50 m^3 und 25 m^3 mußte als Nachteil hierbei das ungünstigere Volumen-Oberflächen-Verhältnis der kleineren Einheiten hingenommen werden; vorteilhaft wirkten sich bei den Großbecken die schrägen

Seitenwände aus, die eine Entleerung in der Frostperiode erübrigte. In allen Becken herrschte Dauerstagnation.

Ab Sommer 1980 standen zusätzlich 6 quadratische Kleinstbecken aus Beton (3,8 x 3,8 m, Vol. ca. 10 m³) sowie 2 Plastik-Rundbecken vergleichbaren Volumens zur Verfügung. Neben der Weiterführung der Untersuchungen in den großen Versuchseinheiten (Dauerstagnation und ohne Eingriffe in die "natürliche" Entwicklung) erfolgte im Zeitraum September-November 1980 die Verbindung von den 6 kleineren 10-m³-Betonteichen zu 2 Dreiergruppen in einem Durchflußsystem, das zusammen mit 2 entsprechenden Vergleichseinheiten Aufschluß über die Auswirkung von kontinuierlicher Wasserbewegung und -belüftung sowie massiver anorganischer Nährstoffzufuhr (P und N, letzterer differenziert als NH_4^+ bzw. NO_3^-) auf die biologische Entwicklung bringen sollte. Beim Betrieb dieses Systems kam ausschließlich aufbereitetes Grundwasser zum Einsatz.

Im Jahr 1981 standen die im Hinblick auf spätere Chemikalienprüfungen entscheidenden Fragen nach dem Grad der "Parallelität" biologischer Entwicklung in Einheiten mit identischen Startbedingungen und deren Beeinflussung im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die Kleinstbecken wurden unter Berücksichtigung der für die Versuche erforderliche Mindestzahl von je 3 Versuchs- und Kontrollteichen nicht mehr im Verbund gefahren. Zwei Varianten des Vorgehens wurden erprobt: Während in 3 der 6 Betonbecken die aus einem gemeinsamen Pool mit altem Mischwasser entnommene Füllung nach jeweils 2 Monaten verworfen und durch neues Mischwasser aus dem mit Marienfelder Wasser wieder aufgefüllten Pool ersetzt wurde, unterblieb diese Neufüllung in den 3 anderen Einheiten. In allen Becken herrschte Dauerstagnation.

Hatte der ursprüngliche Verzicht auf jeglichen Eingriff in die biologische Entwicklung wiederholt eine relativ starke biotische Diversifikation zwischen anfangs praktisch identischen Wasserkörpern zugelassen (siehe Zwischenberichte), wurde nun versucht, dieser durch multiplen Überkreuzaustausch geringer Wassermengen (wöchentlich 25 l) zwischen je 2 Becken - im jeweils ersten Monat des Versuchsansatzes - vorzubeugen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Betonteiche als künstlicher Lebensraum - Vergleich mit natürlichen Gewässern

Außer durch den bereits erwähnten (anfänglichen) Mangel an Sediment waren die Entwicklungsbedingungen für die Organismen in den Betonteichen vor allem durch starke Schwankungen der Wassertemperatur (festgestellte maximale Tagesamplituden 8 - 9 °C - vergl. Anl. 8 zum Jahresbericht 1980/81) und des Lichtklimas gekennzeichnet.

Der Verzicht auf zusätzliche Einbringung von anorganischen Nährstoffen hatte - mit Ausnahme der Silikate - deren weitgehende Erschöpfung während des größten Teils der Vegetationsperiode zur Folge. Die in Zeiten sehr niedriger Gehalte an freiem, gelösten Phosphat und Stickstoff ermittelten Konzentrationen des Chlorophylls a als Äquivalent pflanzlicher Biomasse waren auf den schnellen Abbau abgestorbener Organismen und die daraus resultierende baldige Wiederverfügbarkeit der Nährstoffe zurückzuführen. Es zeigte sich hier die starke physiologische Auswirkung eines zwar mengenmäßig sehr schwachen, jedoch ständigen Nährstoffstromes. Hierzu trugen die geringen P- und N-Gehalte der Niederschläge sowie sonstige über die Luft eingebrachte organische Materie bei. Die rasche Mineralisierung der abgestorbenen Organismen wurden durch die auffallend geringe Körpergröße eines Großteils der dominanten Formen sowie deren meist wenig resistente Zellwandstrukturen begünstigt.

Von Bedeutung - auch insbesondere für die biologische Entwicklung - war schließlich die geringe räumliche Gliederung der Becken. Demgegenüber verfügen natürliche kleinere, stehende Gewässer normalerweise über ein besonders an organischen Stoffen reiches Sediment; freie steinige Oberflächen wie im Falle der Betonteiche sind nicht oder nur in geringem Umfang vorhanden. Der Makrophytengürtel und die in Abhängigkeit von Tiefe und Trübung auch in der zentralen Region entwickelte benthische

Vegetation sind Basis für die Bildung verschiedener Kleinstlebensräume, ersterer reduziert zudem in starkem Maße die Windwirkung, so daß es zeitweise mit zunehmender Tiefe zu physikalisch-chemischen Schichtungen im Freiwasser kommt. Letzteres ist wie die Bodenzone gewöhnlich durch ein hohes Nährstoffangebot gekennzeichnet, das als eine Grundvoraussetzung intensiver Bioproduktion zu starken Verschiebungen von O_2 -Gehalt, pH und Schwebstoffen beitragen kann.

Gemeinsam sind den hochgradig künstlichen Lebensräumen und den natürlichen entsprechenden Flachgewässern die extrem variablen Temperaturverhältnisse als einer der wichtigsten Faktoren biologischer Entwicklung.

3.2 Die Planktonentwicklung in den Betonteichen*)

3.2.1 Die Entwicklung des Planktons unter den gegebenen Freilandbedingungen

3.2.1.1 Startphase

Entsprechend den unter 3.1 beschriebenen Versuchsbedingungen in den Betonteichen, die nur einer begrenzten Zahl der eingebrachten Organismen mehr oder weniger optimale Lebensbedingungen boten und von ihnen die Tolerierung oder Kompensation erheblicher Milieuwiderstände forderten, ließ die Entwicklung der aus dem Schlachtensee überführten Planktonlebensgemeinschaft bereits in den ersten Wochen "verarmen" bzw. erhebliche Unterschiede zu der Organismenzusammensetzung im Ursprungsgewässer erkennen.

Als ein wichtiger, auslösender und steuernder Faktor bei der Herausbildung dieser Differenzen müssen die in den Versuchsteichen instabileren Temperaturverhältnisse angesehen werden, während nach den vorliegenden Meßdaten das anorganische Nahrungsangebot für die Produzentenentwicklung erst in den folgenden Monaten eine entscheidende Bedeutung gewann.

Mit zunehmender Verweildauer in den Betonbecken kam es zu einer

*) (Details zu Artenspektren, Abundanz- und Dominanzverhältnissen, Biomasseentwicklung und jahreszeitlichen Aspekten enthalten die Zwischenberichte und ihre Anlagen)

immer stärkeren Verschiebung der Dominanzverhältnisse, einer Reduzierung der Biomasse sowie der Vielfalt an Arten mit beträchtlicher Individuendichte. In steigendem Maße war zunächst ein Auftreten von dichten Populationen solcher Taxa zu beobachten, die im Schlachtenseeplankton keine wesentliche Rolle spielen, sondern eher für stehende Kleinstgewässer charakteristisch sind (z.B. *Bosmina longirostris*).

Im Mischwasser blieb trotz des 80%igen Betriebswasseranteils der Einfluß der Schlachtenseekomponente in den ersten Wochen für Artenspektrum und Dominanzverhältnisse bestimmend, so daß die Diversität noch etwa jener in den Becken mit Schlachtenseewasser vergleichbar war; das dort festgestellte Nachlassen der Besiedlungsdichte trat jedoch auch im Mischwasser ein.

Dagegen unterschied sich die anfängliche Planktonentwicklung in den mit Marienfelder Wasser gefüllten Teiche erwartungsgemäß stark von jener in den anderen Wasserkörpern. Die auch in natürlichen Ökosystemen bei der Erschließung neuer Lebensräume ablaufenden Prozesse fanden in den sich einstellenden Sukzessionen ihren charakteristischen Ausdruck: ihrer physiologischen Plastizität, der Allgegenwart ihrer Vermehrungskörper und der extrem raschen Generationsfolge entsprechend, kamen zunächst Bakterien und Einzeller zum Zuge. Es bildete sich eine in der Zusammensetzung für natürliche stehende Gewässer atypische Biozönose geringer Biomasse, die u.a. durch ein Massenvorkommen von *Pandorina morum* gekennzeichnet war.

3.2.1.2 Vegetationsperiode 1980 und 1981

Mit fortschreitender Versuchsdauer ließ der Einfluß der Ausgangsbedingungen auf die Entwicklung naturgemäß nach. Die fehlende Erneuerung der Füllung und die in allen Versuchseinheiten nahezu gleiche Wirkung klimatischer Faktoren führten nicht nur zu allmählicher Angleichung wesentlicher abiotischer Lebensbedingungen, so auch im Chemismus der Wasserkörper, sondern auch im Verein mit der systematischen Elimination aller nicht zur

Anpassung an die spezifischen Gegebenheiten in den Becken fähigen Arten und Förderung euryöker Formen zu einem beträchtlichen Grad struktureller Übereinstimmung zwischen den Planktonzönosen aller Becken.

Allerdings war wiederholt eine gegenläufige Tendenz festzustellen: Nicht nur zwischen Einheiten gleicher Ausgangsfüllung und verschiedener Größe, sondern selbst zwischen Becken gleicher Ausgangsfüllung und Größe konnte es zu einem erheblichen Auseinanderlaufen der biologischen Entwicklung kommen, wobei der Beckengröße offenbar kein wesentlicher Einfluß zukam. Die Diversifikation erstreckte sich nicht nur auf das Plankton, sondern schloß auch das Benthos ein, speziell dessen größere Vertreter. Eine besondere Rolle spielte die Fadenalge *Cladophora*, die sich besonders in der Vegetationsperiode 1980 in je einer der Vergleichseinheiten mit früherem Schlachtensee- und Mischwasser zu umfangreichen Beständen entwickelte und so Einfluß auf Licht- und Nährstoffangebot in den betreffenden Becken nahm.

Die großen 100 m³-Versuchseinheiten konnten zumindest unter Beibehaltung des vereinbarten Verzichts auf ggf. stabilisierende Eingriffe nicht als geeignete Basis späterer Chemikalienprüfungen angesehen werden, da bei letzteren sichergestellt sein muß, daß innerhalb der Gruppen von Kontroll- und Versuchsgefäßen eine hochgradige vergleichbare Entwicklung abläuft und zudem festgestellte Differenzen zwischen beiden Gruppen eindeutig auf Effekte der eingebrachten Chemikalie zurückzuführen sind. Insbesondere spielt bei dieser Betrachtung auch die Schwierigkeit einer repräsentativen Probenahme eine Rolle.

3.2.2 Die Entwicklung des Planktons bei gesteigerter Turbulenz und erhöhtem Nährstoffangebot

In einem Durchflußsystem (siehe Zwischenbericht 1979/80) wurde aufbereitetes Grundwasser mittels Belüftung in Turbulenz gehalten und mit Nährstoffen (Phosphor und Stickstoff) angerei-

chert. Der Stickstoff wurde entweder als NH_4^+ -Stickstoff oder als NO_3^- -Stickstoff zugegeben und jeweils die daraus resultierende Planktonentwicklung verfolgt:

Die massenhaft auftretenden Arten entsprachen denen aus den nährstoffarmen, dauerstagnanten Betonteichen. Auch hier war eine absolute Dominanz des Phytoplanktons mit kontinuierlichem Vorherrschen einiger Grünalgenformen und geringer, stark schwankender Zooplanktonentwicklung festzustellen.

Es lag ein hoher Grad an Übereinstimmung im Artenspektrum der beiden Teichserien mit NH_4^+ -Stickstoff und NO_3^- -Stickstoff vor. Das Ergebnis der starken Nährstoffzugabe war insbesondere eine Steigerung der Konzentration an pflanzlicher Biomasse.

Zusätzlich wurde in zwei Kleinstteichen die Auswirkung einerseits von Dauerstagnation und andererseits kontinuierliche, schwache Wassenumwälzung auf die Planktonentwicklung untersucht. Angeimpft wurden die Wasserkörper mit Havelplankton:

Beide Wasserkörper unterschieden sich nur geringfügig in ihrem Artenspektrum. Der Shannon-Diversitätsindex lag bei kontinuierlicher Umwälzung des Wasserkörpers insgesamt etwas niedriger. Die Entwicklung des aus der Havel zugeführten Planktons wurde unterdrückt. Wie auch in den übrigen Teichen des Untersuchungsprogramms war hier bei Dauerumwälzung ein massenhaftes Vorkommen einiger Grünalgenspezies festzustellen. Auch bei gesteigerter Turbulenz übertrafen die gemessenen Chlorophyll a-Maxima nicht die in den nährstoffarmen, dauerstagnanten Betonteichen.

Weiterhin wurden Versuche zur Auswirkung von intensiver, kontinuierlicher und diskontinuierlicher Umwälzung bei P-

und N-Limitation durchgeführt:

Es zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung beider Wasserkörper im Artenspektrum und eine hohe Anpassungsfähigkeit der Marienfelder euryöken Formen bzw. Entwicklungshemmung des in diesen Versuchen eingebrachten Schlachtenseeplanktons.

Mit fortschreitender Versuchsdauer blieb die pflanzliche Biomassenentwicklung im Becken mit diskontinuierlicher Umwälzung stark hinter der im anderen Becken zurück, wobei jedoch auch in letzterem keine höheren Werte als in dauerstagnanten Wasserkörpern entsprechenden Nährstoffangebots erreicht wurden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Untersuchungen bei unterschiedlicher Turbulenz und Nährstoffverfügbarkeit eine auffallende Übereinstimmung in Artenspektrum und Dominanzverhältnissen ergaben.

3.2.3 Zusammenfassende Charakterisierung des Planktons in den Betonteichen

Nach der Phase der Entwicklungshemmung bei zahlreichen eingebrachten Schlachtenseeorganismen und der gleichzeitigen Adaptation anderer, euryöker Formen an die spezifischen Bedingungen der Versuchsbecken ließen die auftretenden Planktongemeinschaften aller Becken folgende Gemeinsamkeiten erkennen:

Die Vielfalt an Arten und Lebensformen war erwartungsgemäß im Vergleich zu entsprechenden natürlichen Gewässern stets gering. Als besonders stark limitierende abiotische Faktoren wirkten sich hierbei extreme Temperaturverhältnisse und die geringe Gliederung des Betonteichs als künstlicher Lebensraum aus. Die Diversität war in den Jahren 1980 und 1981 etwa gleich: Jeweils 40 - 50 Arten traten massenhaft^{*)} oder häufig^{*)}

*) Siehe unter Methodenteil Zwischenbericht

auf, unter ihnen nur wenige Euplankter.

Das Artenspektrum aller Versuchsteiche wies einen beträchtlichen Grad an Übereinstimmung auf. Die Dominanzverhältnisse hinsichtlich der wesentlichen systematischen Großgruppen ließen ein starkes Vorherrschen der Grünalgen im Gesamtspektrum erkennen. Hier sind vergleichbare Verhältnisse zur Planktonentwicklung in natürlichen - allerdings oft viel nährstoffreicheren - Gewässern erkennbar. Im Phytoplankton traten die Kieselalgen insgesamt zurück und hierbei insbesondere die Centrales. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in den gewöhnlich viel formenreicheren natürlichen stehenden Gewässern mit ihrem oft sehr raschen und starken Wechsel des Faunen- und Florenbildes zeigte die Phytoplanktonentwicklung in den Betonteichen als Besonderheit die sich fast über die gesamte Vegetationsperiode erstreckende auffallende numerische Dominanz einiger weniger, physiologisch besonders anpassungsfähiger Grünalgenarten. Unter diesen Dauerdominanten müssen einige Vertreter der Chlorococcales sowie Cosmarium (Desmidiaceae) erwähnt werden; auf Grund ihrer relativ konstanten, sehr hohen Individuendichte stellen sie einen erheblichen Anteil der pflanzlichen Biomasse.

Auch Blaualgen erlangten weder in den nährstoffarmen Wasserkörpern noch im hypertropen Milieu des Durchflusssystems einen höheren Anteil an der pflanzlichen Biomasse.

Das Zooplankton war hinsichtlich seiner Dominanz und Biomasse im Vergleich zu den Verhältnissen in der Mehrzahl vergleichbarer natürlicher Gewässer im Gesamtplankton der Becken stark unterrepräsentiert und zudem artenarm. In ihm dominieren gewöhnlich Ciliaten und Rotatorien, neben denen in der Vegetationsperiode 1980 wiederholt Crustaceen Copepoden und Cladoceren in Populationen beträchtlicher Individuendichte vorkamen, während in der Vegetationsperiode 1981 Cladoceren kaum in Erscheinung traten mit Ausnahme von Scapholeberis, die tagsüber Element des Neustons ist. Als Vertreter des Makrozooplanktons kamen dagegen in der Vegetationsperiode 1981 bei

höheren Wassertemperaturen Chaoboruslarven (Diptera) in größerer Dichte vor.

Die Biomasse und ihr trophischer Status:

Trotz der im Frühjahr einsetzenden, anhaltenden Erschöpfung freier anorganischer Phosphor- und Stickstoffverbindungen, die von sehr geringen Mengen gelösten organischen Kohlenstoffs begleitet wurden, ließen die außerhalb des Winters festgestellten Chlorophyll a-Konzentrationen auf das Vorliegen schwacher Eutrophie schließen. Beim Eintritt sehr hoher Wassertemperaturen (um 25 °C) konnte es jedoch zu einem drastischen Rückgang der Chlorophyll a-Konzentration auf Werte kommen, die etwa den gewöhnlich oligo- bzw. mesotrophen Verhältnissen der Winterpause entsprachen.

Im Gegensatz zu den Phytoplanktern nutzten die Zooplankter in den Betonteichen das vorhandene Nahrungsangebot nur in einem sehr beschränkten Maße aus. Dies zeigt sich besonders bei Betrachtung von Algenformen, die in hoher Kontinuität und beträchtlicher Individuendichte zur Verfügung standen. Die als Dauerdominanten auftretenden Grünalgenarten erscheinen als gut aufschließbare Nahrung für zahlreiche filtrierende oder strudelnde Primärkonsumenten. Ihr Größenspektrum erlaubte z.B. grundsätzlich die Nutzung sowohl durch Filtrierer, die auf eine begrenzte Partikelgröße angewiesen sind, als auch durch andere, die Nahrungsteilchen stark unterschiedlichen Umfangs aufnehmen.

An sich besitzen die in den Betonteichen in nennenswerter Dichte festgestellten planktischen Primärkonsumenten ausgezeichnete Voraussetzungen für eine rasche Anpassung an das jeweilige Nahrungsangebot, speziell an dessen Quantität: Selbst die Vertreter der Metazoen zeichnen sich bei günstigen Wassertemperaturen durch eine sehr kurze, weniger als eine Woche betragende Generationsdauer aus. Hinzu kommt als weiterer Entwicklungsvorteil bei Rotarien und Phyllopoden die Möglichkeit einer parthenogenetischen Vermehrung. Schließlich muß erwähnt werden, daß das Fehlen von planktonfressenden Fischen und das

erst im Sommer erfolgende Auftreten großer Chaoborus-Larven in merklicher Individuendichte eine günstige Voraussetzung für die Entwicklung auch großer Primärkonsumenten, wie Daphnia, darstellte. Generell erscheint somit die in natürlichen Gewässern gewöhnlich vorliegende Limitierung der Herbivorentwicklung durch Räuber in den Versuchsteichen nicht gegeben.

Die Stabilität von Zusammensetzung und Entwicklung der Planktongemeinschaften in den Bodenteichen kann je nach Wahl der entsprechenden Kriterien unterschiedlich bewertet werden. Bei einer Definition der Stabilität als "Gleichförmigkeit in der Zeit" und bei Heranziehung des Artenspektrums und der Dominanzwerte als Kriterien müßten die Planktonbiozönos in den künstlichen Teichen im Vergleich etwa zu jenen der Weiher sowie "natürlicher" Teiche höheren Alters als stabil erscheinen. Die in den Versuchsbecken festgestellte relativ starke Uniformität des Artenbildes ist nicht Ausdruck einer den Biozönos immanenten echten Stabilität. Dies wird deutlich, wenn man Stabilität als Vermögen definiert, auf der Basis qualitativer und quantitativer Ausgewogenheit im Netz der Beziehungen zwischen den Komponenten der Zönose die Wirkungen externer Störfaktoren abzuwehren. Wie andere Lebensgemeinschaften niedriger Diversität und geringen Entwicklungsalters tendieren die Biozönos in den Betonteichen vielmehr dazu, bei starkem chemischen oder physikalischen Streß von den Streßfaktoren in verstärktem Maße kontrolliert zu werden.

3.3 Untersuchungen zum Benthos in den Betonteichen

Da in Analogie zu den Abläufen in natürlichen Gewässern wechselseitige Beziehungen zwischen den Biozönos von Beckenboden und Freiwasser vorauszusetzen sind, ist die Kenntnis des Benthos von großer Bedeutung, jedoch wurden in den vorliegenden Untersuchungen schwerpunktmäßig nur Planktonorganismen berücksichtigt:

- Das sich in den Teichen einstellende Benthos erwies sich

bei vergleichender Betrachtung der Verhältnisse in natürlichen Gewässern infolge seiner taxonomisch sehr einseitigen Zusammensetzung weniger repräsentativ als die sich entwickelnden Planktongemeinschaften.

- Die Verwendung des Benthos in der ökotoxikologischen Chemikalienprüfung ist wegen der erfahrungsgemäß oft extrem starken Emergenz der im Marienfelder Makrobenthos zahlenmäßig dominierenden Insekten problematisch. Hinzu kommen die unkontrollierten Flucht- bzw. Ausweichreaktionen flugfähiger Wanzen, Käfer etc. bei Schadstoffzusatz, deren Verhinderung den methodischen Aufwand erhöhen und zugleich ein zusätzliches unnatürliches Verhalten beinhalten würde.
- Eine weitere Schwierigkeit der Benthosuntersuchungen gegenüber denen des Planktons ist die Auswirkung der inhomogeneren Verteilung von Substrat und Besiedlung bei der Probenahme.
- Bei den Benthosuntersuchungen ergab sich gegenüber dem Plankton eine weitaus geringere Artenvielfalt.

Eine epilithische Mikrofauna und -flora stellte sich in nennenswerter Dichte an den Wänden der Teiche erst nach und nach mit deren Bedeckung durch eine dünne Sedimentschicht ein. Dagegen fand eine rasche Besiedlung durch zufliegende Wasserinsekten (u.a. Wasserwanzen) und Mückenlarven statt. Neben ihnen traten zunehmend Eintagsfliegenlarven auf.

Mit Cladophora kam erst im Sommer des 2. Untersuchungsjahres ein Vertreter der Makroflora in mehreren großen Becken zu einer starken Entfaltung. Der Aufbau ihrer dichten Bestände ging von den sedimentarmen Seitenwänden der Becken aus. Der Cladophora-Aufwuchs wies nur ein sehr geringes Periphyton auf.

Die sich infolge des Eintrags über die Luft sowie der Sedimentation abgestorbener Organismen langsam verstärkende Sedimentschicht wurde zunehmend von Mücken- und Libellenlarven sowie Wasserkäfern besiedelt. Für Vertreter diverser taxonomischer Gruppen, die für das Makrobenthos natürlicher stehender Gewässer

charakteristisch sind, wie Schnecken und peracaride Krebse, war dagegen ein sekundäres Eindringen unmöglich.

Im pflanzlichen Mikrobenthos herrschten Formen vor, die zugleich häufig im Plankton der Teiche auftraten. Demnach lag hinsichtlich dieses Merkmals eine grundsätzliche Übereinstimmung mit den Verhältnissen in natürlichen Kleinstgewässern vor, obwohl das spezifische Artenspektrum des Planktons der Betonteiche für ein Kleinstgewässer keineswegs typisch ist. Die Erklärung für das Phänomen der weitgehenden Ähnlichkeit von Mikroplankton und -benthos in den Betonteichen liegt in erster Linie nicht - wie bei den meisten natürlichen Kleinstgewässern - in den günstigen Ernährungsbedingungen im freien Wasser, sondern in der Begünstigung stark euryöker Formen durch andere abiotische Faktoren, wie z.B. der Temperatur.

Hinsichtlich der Dominanzverhältnisse im Plankton bzw. Benthos waren dagegen erwartungsgemäß beträchtliche Unterschiede festzustellen: So lag der Anteil von Blaualgen (*Oscillatoria*) und Kieselalgen (z.B. *Amphora*) im Benthos durchschnittlich höher.

Als echte Benthosorganismen kamen über Faulschlammansammlungen zeitweise - so im Sommer und Herbst 1981 - Pilze zur Massenentwicklung. Ausschließlich im Bereich des Sediments wurden als weitere Vertreter des Mikrobenthos u.a. einige Rotatorien, wie *Cephalodella* und *Monommata*, festgestellt.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Strukturelle und funktionelle Eignung der Planktonzönosen als Chemikalien-Prüfsystem

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob und wie in den künstlichen Gewässeranlagen des BGA (hier: Betonteiche) eine aquatische Lebensgemeinschaft bereitgestellt werden kann, die sich für die Prüfung von Chemikalien auf subletale Langzeitwirkungen unter Freilandbedingungen eignet. Voraussetzung für die strukturelle und funktionelle Eignung der in den Betonteichen sich entwickelnden Plankton-

zönosen ist eine, im Vergleich zum natürlichen Gewässer, ausreichende Artenvielfalt und Individuendichte. Dieses beinhaltet, daß auch die grundlegenden Elemente der Nahrungsbeziehungen vorhanden sind. Hierzu sollten die verschiedenen trophischen Ebenen so besetzt sein, daß die innere Stabilität der Lebensgemeinschaften begünstigt wird.

Die pflanzliche Biomasse entsprach in ihrer Zusammensetzung und Dichte einem meso- bis schwach eutrophen, stehenden Gewässer. Stellt man die zu Struktur und Sukzessionen erhaltenen Befunde den genannten Eignungskriterien eines Chemikalien-Prüfsystems gegenüber, so ergibt sich:

- Die festgestellte Artenvielfalt entsprach außerhalb der Perioden minimaler und maximaler Wassertemperaturen den für Chemikalienprüfungen mit Multispeziessystemen zu stellenden Anforderungen.
- Die für quantitative Bestimmungen erforderliche Abundanz wurde von einer ausreichend großen Zahl von Spezies erreicht; mittels der Utermöhl-Methode sind daher Abundanzverschiebungen in der Folge inhibitorischer oder induktiver Chemikalienwirkungen gut bestimmbar.
- Das Arten- und besonders das Gruppenspektrum sind durchaus repräsentativ für ein natürliches, stehendes Gewässer. Die beobachtete starke Dominanz der Grünalgen und die selbst bei hohen Temperaturen unterdrückte Blaualgenentwicklung sind positiv zu bewerten.
- Das oft über mehrere Monate andauernde massenhafte Auftreten einiger weniger Arten (speziell von Grünalgen) ist zwar nicht typisch für kleinere, natürliche Gewässer, wirkt sich jedoch auf die Durchführbarkeit entsprechender Chemikalienprüfungen günstig aus und kann hingenommen werden, so lange nicht eine zu große Artenarmut mit dem Fehlen ganzer charakteristischer Stämme und Klassen eintritt.
- Die Besetzung der trophischen Ebenen war im Plankton der Betonteiche unausgewogen: Primär- und Sekundärproduzenten

waren beim Vergleich ihres relativen Biomassenanteils in natürlichen Gewässern insgesamt unterrepräsentiert. Dieser Tatbestand ist im Hinblick auf Chemikalienprüfungen negativ zu bewerten, da er auf ein Defizit an inneren biologischen Regulationsmechanismen des Systems hinweist; die Instabilität von Struktur und Stoffumsatz der Biozönosen bei Einwirkung abiotischer Störfaktoren wird begünstigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die in den Betonteichen auftretenden Planktonzönosen durchaus hinsichtlich ihrer Struktur und Entwicklung eine geeignete Basis für die ökotoxikologische Freilandprüfung von Chemikalien darstellen.

4.2 Vergleichbarkeit ("Gleichlauf") der biologischen Entwicklung in den Versuchsteichen

Nachdem bereits in den Vegetationsperioden 1979 und 1980 eine starke biologische Diversifikation selbst zwischen Wasserkörpern gleicher Ausgangszusammensetzung, gleichen Entwicklungsalters und gleichen Volumens beobachtet worden war, konnte dieses Ergebnis auch in der Vegetationsperiode 1982 bestätigt werden. Es zeigte sich, daß auch ein höheres Alter von Wasserkörper und Biozönose nicht die erforderliche Übereinstimmung der Planktonentwicklung in Kontroll- und Versuchsbecken gewährleistet.

Der unter Punkt 2 (Seite 4) beschriebene Versuchsansatz ergab, daß die zu fordernde weitgehende Übereinstimmung der biologischen Entwicklung dominanter Arten mit hoher Wahrscheinlichkeit selbst bei äußerst geringen Nährstoffgehalten des Wassers über mehrere Wochen (siehe Abb. 1 - 3) durch wiederholten Überkreuzaustausch von Wasser nach einer kurzen Startphase erreicht werden kann. In den Betonteichen genügte dazu der einmalige multiple Austausch von nur 25 l zwischen je 2 Betonteichen (10 m^3) während des ersten Monats nach erfolgter Füllung. Das Maß der erfolgten Stabilisierung erscheint besonders hoch, wenn man die generell beträchtliche Variabilität des biologischen Materials berücksichtigt.

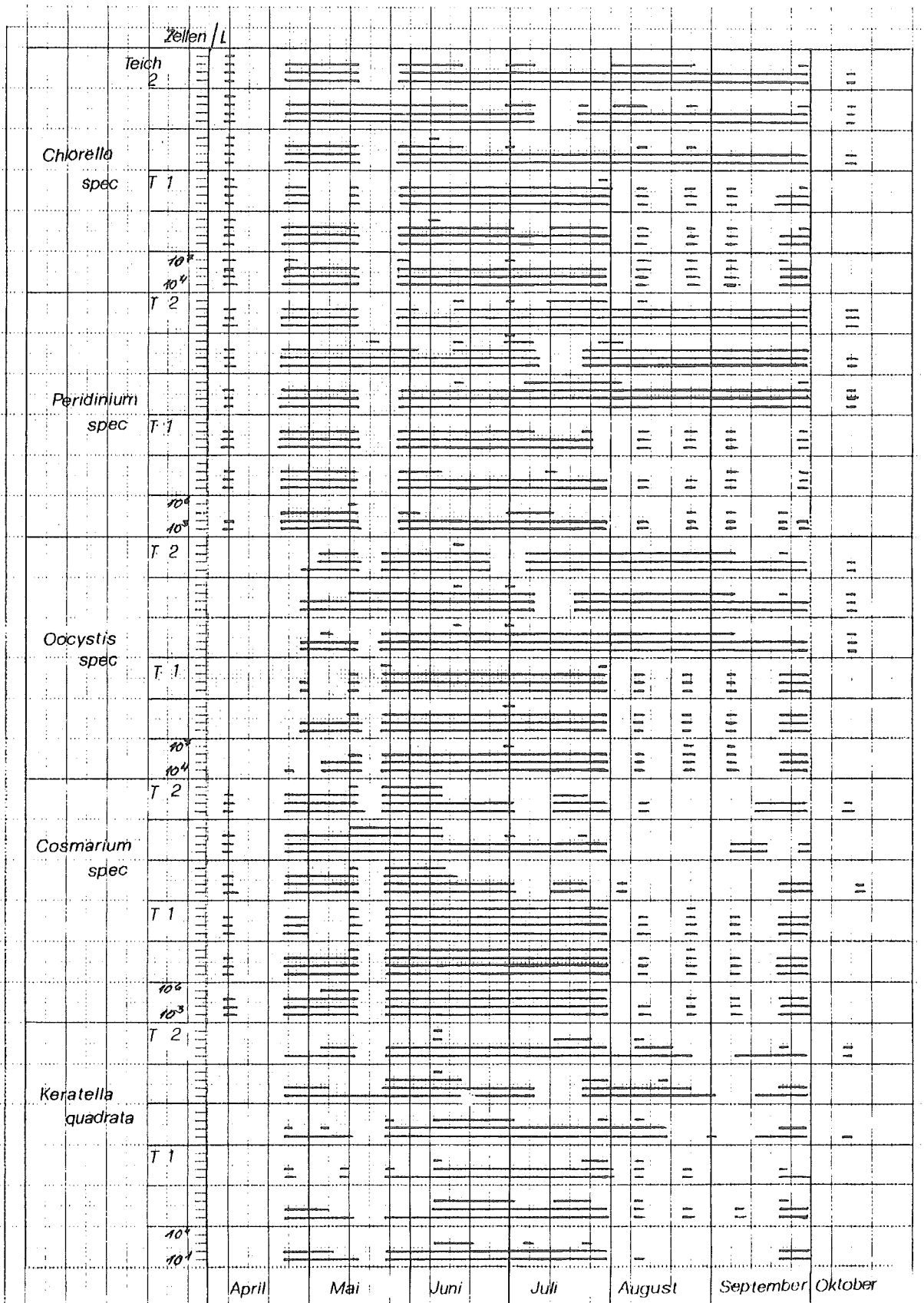


Abb. 1

(Teichserie 1 u. 2 = T 1 u. T 2)

Abundanz ausgewählter, dominanter Planktonorganismen

(Bestimmung nach Utermöhl) in den Betonteichen (Volumen=10 m³).

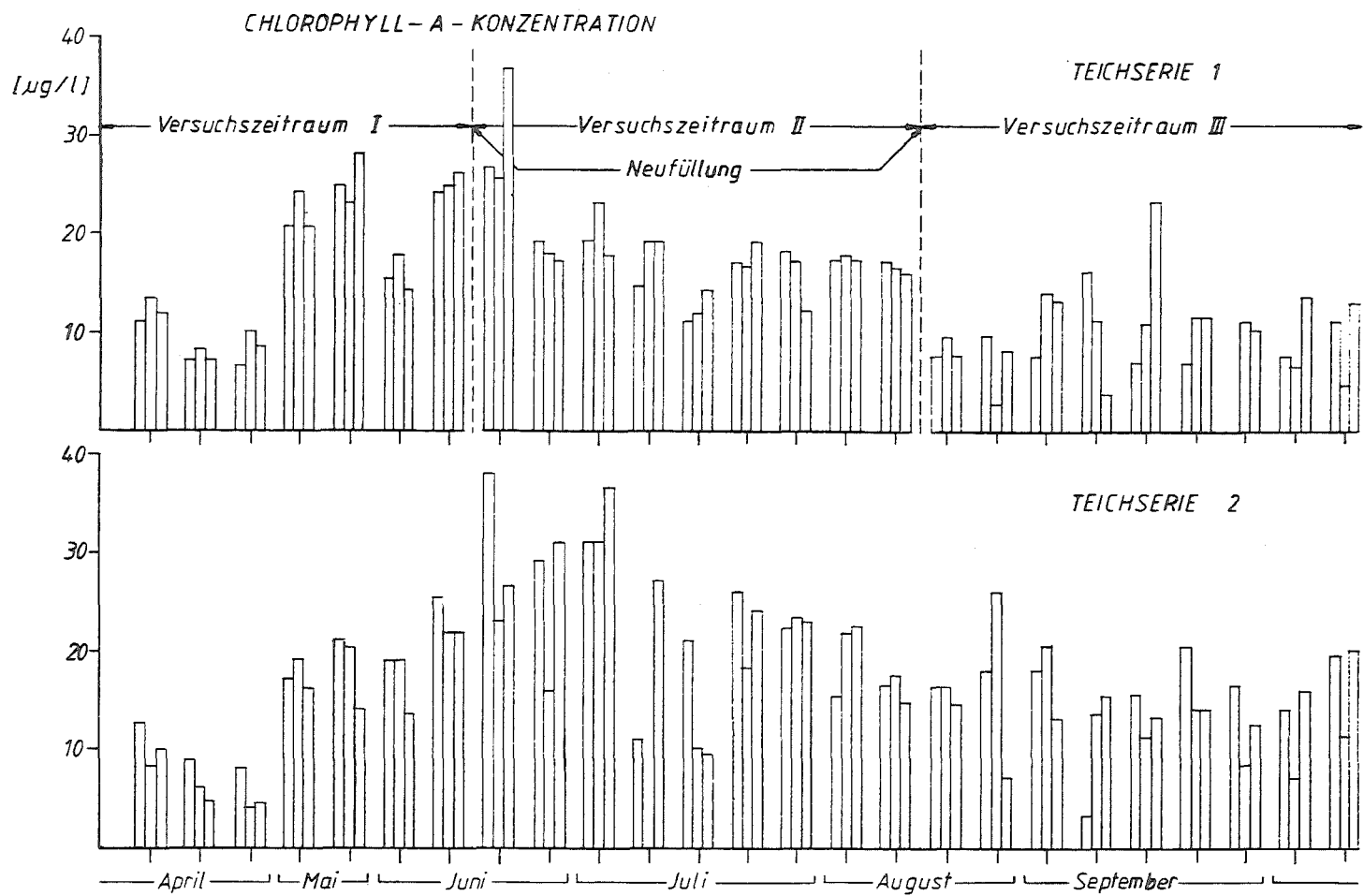


Abb. 2
Chlorophyll a Gehalt in den Betonteichen (Volumen=10 m³)

Erkennbar sind in Abb. 1 besonders im Fall der Phytoplankter die hohe Konstanz des massenhaften Auftretens, dessen geringe Variabilität innerhalb der Beckengruppen sowie die insgesamt hohe Übereinstimmung der Entwicklung (Sukzessionen) dieser Arten in beiden Teichserien.

Während der beiden ersten Monate ist eine gute Übereinstimmung der Chlorophyll-a-Entwicklung in den jeweils 3 Teichen der Teichserien 1 und 2 festzustellen. Nach Neufüllung der Teiche der Serie 1 (Versuchszeitraum II) war der Chlorophyll-a-Gehalt insgesamt niedriger als in der Teichserie 2 ohne Neufüllung. In der Teichserie 1 ist jedoch eine gute Übereinstimmung zwischen den drei Teichen in ihrer Chlorophyll-a-Entwicklung festzustellen. Im Versuchszeitraum III lag die Chlorophyll-a-Konzentration der Teichserie 1 nach Neufüllung wieder niedriger als im ungestörten System der Teichserie 2, jedoch erfolgte hier im Gegensatz zum Versuchszeitraum II keine stabilisierende Wirkung nach dem Wasseraustausch. Es ist nicht auszuschließen, daß hier ungewöhnlich hohe Wassertemperaturen zu Versuchsbeginn destabilisierend wirkten.

Beim Phytoplankton ist auch in Abb. 3 die große Kontinuität der dominierenden Grünalgen auffallend. Sie ist in den Teichen der Serie 1 und 2 festzustellen, wobei die Abundanz-Verschiebungen während mehrerer Monate nur innerhalb einer Zehnerpotenz liegen. Dagegen lassen Kiesel- und Blaualgen Abundanzverschiebungen über mehrere Zehnerpotenzen in den einzelnen Teichen erkennen (keine Abbildung). Das Zooplankton oszilliert besonders stark, die Möglichkeit einer Stabilisierung durch Austausch geringer Wassermengen ist hier scheinbar sehr begrenzt.

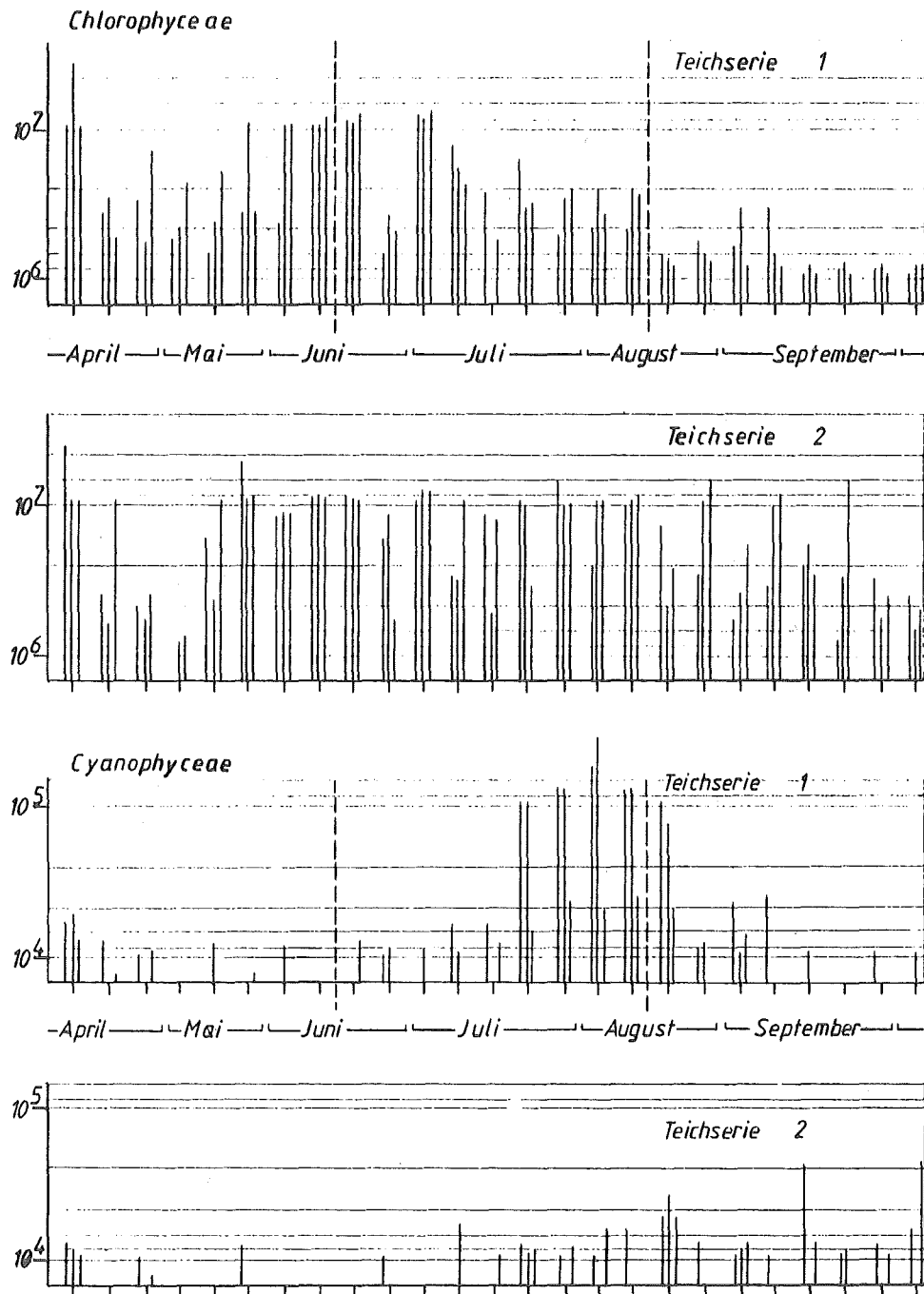


Abb. 3a

Abundanz des Phyto- und Zooplanktons
in den Betonteichen (Volumen= 10 m^3)

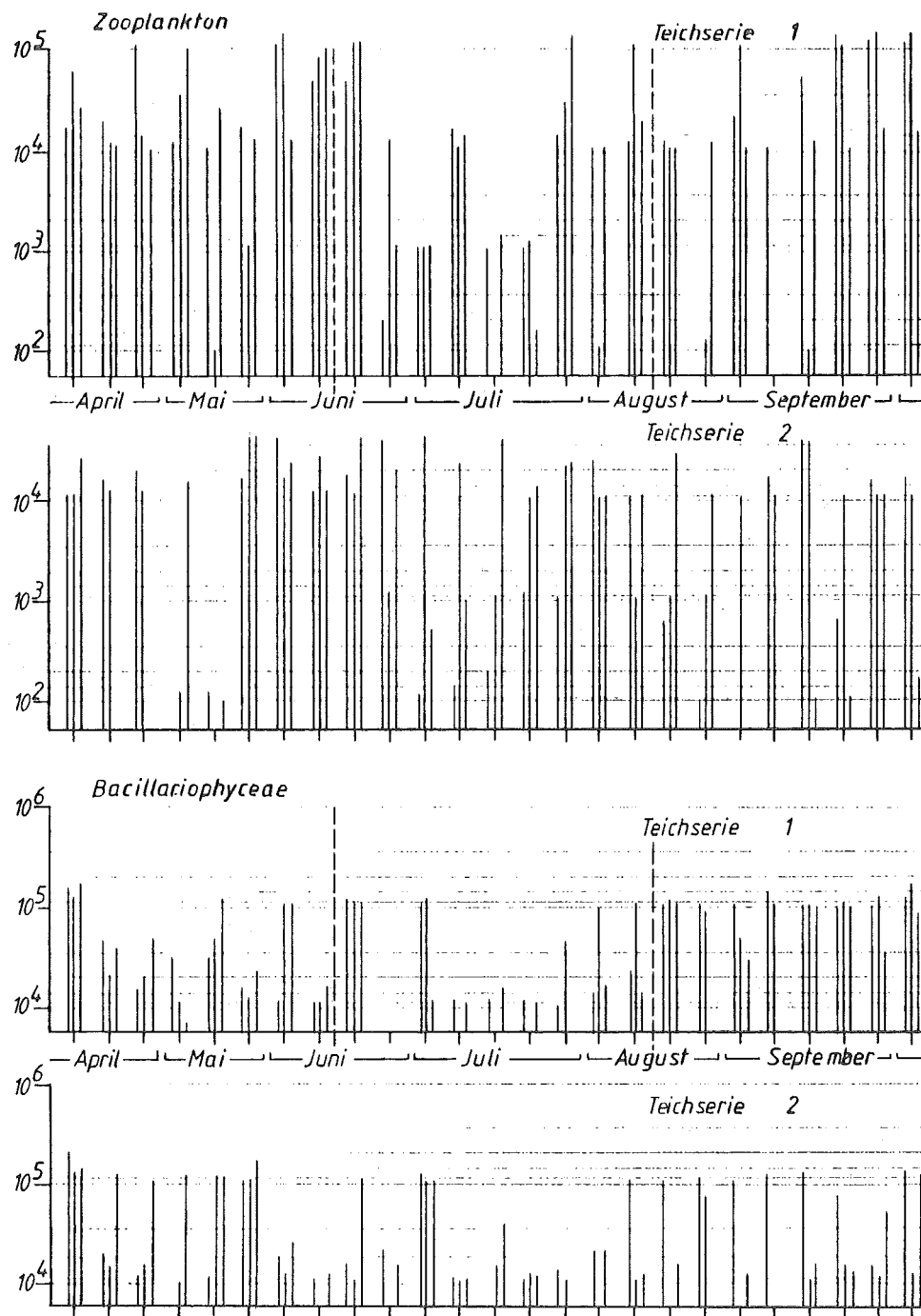


Abb. 3b

Abundanz des Phyto- und Zooplanktons
in den Betonteichen (Volumen=10 m³)

4.3 Weiterführende Untersuchungen

Inwieweit sich die unter Punkt 2 beschriebene Versuchsanordnung als Testsystem eignet, wird in weiteren Experimenten mit Chemikalien zu prüfen sein. Die vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen jedoch, daß man zukünftig eher mit einem über Sediment und Uferzone stabilisierten - mindestens über 18 Monate ungestörten - Kleinstökosystem arbeiten sollte, das dann zur Chemikalienprüfung in entsprechend kleinere Versuchseinheiten unterteilt wird.

Ob jedoch allein eine Vergrößerung des Versuchssystems im Sinne eines "medium scale experiments" in Form der künstlichen Gewässeranlagen des Versuchsfeldes weiterführt, ist offen; zumindest besteht die Gefahr, daß derartige Systeme eine Reihe von Schwierigkeiten vergrößern, z.B. das Auftreten neuer im natürlichen Milieu nicht vorkommender Kunstfehler wie Randeffekte, Schichtung, Turbulenzen, Adsorption, Flüchtigkeit etc.; außerdem sind derartige Experimente sehr zeitaufwendig und teuer. Ihr Vorteil liegt aber unbestritten in der Möglichkeit, mit einer großen Individuenzahl und Population von ausreichender Größe arbeiten zu können.